

بسم الله الرحمن الرحيم



دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی قزوین
دانشکده بهداشت

پایان نامه مقطع کارشناسی ارشد
رشته بهداشت و ایمنی مواد غذایی

عنوان:

تعیین اثر ضد باکتریایی اسانس گیاه خارمشک (*Echinophora orientalis*) بر استافیلوکوکوس
اورئوس در محیط کشت آزمایشگاهی و مدل غذایی

استاد راهنما:

دکتر پیمان قجر بیگی

استاد مشاور:

دکتر رزاق محمودی

نگارنده:

عفت فرزانه نیا

شهریور ۹۵

سپاس خدای را که سخنوران، در ستودن او بمانند و شمارندگان، شمردن نعمت های او ندانند و کوشندگان، حق او را گزاردن نتوانند.

این پایان نامه را ضمن تشکر و سپاس بیکران و در کمال افتخار و امتنان تقدیم می نمایم به:

محضر ارزشمند پدر و مادر عزیزم به خاطر همه ی تلاشهای محبت آمیز ی که در دوران مختلف زندگی ام انجام داده اند و بامهربانی چگونه زیستن را به من آموخته اند.

به استادان فرزانه و فرهیخته ای که در راه کسب علم و معرفت مرا یاری نمودند.

به آنان که در راه کسب دانش راهنمایم بودند.

به آنان که نفس خیرشان و دعای روح پرورشان بدرقه ی راهم بود.

پروردگارا حسن عاقبت، سلامت و سعادت را برای آنان مقدر نما.

چکیده

زمینه: کاهش ایمنی مواد غذایی، افزایش اثرات مضر نگهدارنده های شیمیایی، مقاومت انتی بیوتیکی باکتریهای بیماری زای مواد غذایی توجه پژوهشگران را به مطالعات در زمینه جایگزینی ترکیبات طبیعی بویژه بکارگیری اسانس های گیاهی معطوف کرده است. در سال های اخیر مطالعات گسترده ای فعالیت ضد میکروبی اسانس های گیاهی را به اثبات رسانده است.

هدف: این مطالعه با هدف تعیین اثر ضد باکتریایی اسانس گیاه خارمشک بر استافیلوکوکوس اورئوس در محیط کشت آزمایشگاهی و مدل غذایی در مدت نگهداری (۵ روز) در دمای یخچال مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روشها: گیاه خارمشک از دامنه های کوه بینالود نیشابور جمع آوری و پس از خشک کردن گیاه و آسیاب آن، اسانس گیری توسط دستگاه کلونجر انجام شد. آنالیز ترکیبات اسانس روغنی گیاه خارمشک توسط دستگاه GC-MS^۱ انجام شد. MIC^۲ و MBC^۳ به روش میکروول دایلوژن تعیین شد و همچنین فعالیت ضد میکروبی اسانس در مدل غذایی بر روی استافیلوکوکوس اورئوس ارزیابی شد.

یافته ها: نتایج آنالیز GC-MS نشان داد که اسانس گاما- دکالاکتون (% ۲۱/۱۵)، بتا- سیس اوسیمن (% ۱۵/۲۷)، لینالول (% ۸/۸۲)، اسپاتولنول (% ۷/۷۴)، اوژنول متیل اتر (% ۶/۶۱)، آلفا- ترپیننال (% ۳/۶۸) و آلفا- پینن (% ۳/۱۹) اسانس خارمشک را به خود اختصاص داده بودند. نتایج ارزیابی فعالیت ضد میکروبی اسانس روغنی خارمشک در محیط کشت آزمایشگاهی نشان داد که حداقل غلظت مانع کننده (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) علیه استافیلوکوکوس اورئوس به ترتیب غلظت های ۷۵ و ۱۲۵ میکروگرم در میلی لیتر می باشد.

نتایج بررسی فعالیت ضد میکروبی در مدل غذایی نشان داد که اسانس مورد مطالعه در دمای یخچال کاهش معنی داری در میانگین رشد باکتری مورد مطالعه داشت.

نتایج ارزیابی حسی نشان داد غلظت $6/25 \mu\text{g ml}^{-1}$ از اسانس مورد مطالعه بیشترین پذیرش حسی را داشت.

نتیجه گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که استفاده از اسانس خارمشک با کمترین غلظت بدون ایجاد اثرات حسی و طعمی نامطلوب در مواد غذایی می توان از رشد باکتری های پاتوژن و فسادزا مانع بعمل آورد. با توجه به فعالیت ضد میکروبی این ترکیبات می توان فعالیت آنها را بر روی دیگر پاتوژن های بیماریزا بررسی و به راهکار مناسبی برای غلبه بر آلودگی مواد غذایی با آنها دست یافت.

واژگان کلیدی: خارمشک، گاز کروماتوگرافی متصل به طیف نگار جرمی، فعالیت ضد باکتریایی، استافیلوکوکوس اورئوس، سوپ

1. Gas Chromatography- Mass spectrometry
2. Minimum inhibition concentration
3. Minimum bactericidal concentration

فهرست مطالب

عنوان	صفحه
فصل اول: مقدمه و بیان مسئله.....	أ
۱-۱- بیان مسأله و اهمیت پژوهش.....	۲
۱-۲- هدف اصلی.....	۴
۱-۳- اهداف فرعی.....	۴
۱-۵- فرضیات پژوهش.....	۵
۱-۶- سوالات پژوهش.....	۵
۱-۷- خارمشک.....	۶
۱-۷-۱- معرفی گیاه.....	۶
۱-۷-۲- ویژگی های گیاهی.....	۷
۱-۷-۳- ترکیبات موثره خارمشک.....	۷
۱-۷-۴- موارد مصرف.....	۷
۱-۷-۵- پراکنش جغرافیایی.....	۸
۱-۷-۶- خواص درمانی خارمشک.....	۸
۱-۷-۷- تصاویر گیاه خارمشک.....	۱۰
شکل ۱-۳- گیاه خارمشک.....	۱۰
فصل دوم: بررسی متون.....	۱۱
۲-۱- اسانس گیاهان دارویی.....	۱۲
۲-۲- اهمیت استفاده از اسانس گیاهان دارویی.....	۱۴

۳-۲- تاریخچه استفاده از اسانس ها.....	۱۵
۴-۲- کاربرد اسانس گیاهان دارویی.....	۱۸
۵-۲- استخراج اسانس گیاهان دارویی.....	۲۰
۲-۵-۱-۱- تقطیر با آب.....	۲۰
۲-۵-۱-۲- تقطیر با بخار.....	۲۱
۲-۵-۱-۳- تقطیر با آب و بخار.....	۲۲
۲-۵-۲- فشردن.....	۲۲
۳-۵-۲- استخراج به کمک حلال.....	۲۳
۴-۵-۲- استخراج به کمک گازها.....	۲۳
۶-۲- آنالیز اسانس گیاهان دارویی.....	۲۵
۲-۶-۱- روشهای کروماتوگرافی.....	۲۶
۲-۶-۱-۱- کروماتوگرافی مایع - مایع (LLC).....	۲۶
۲-۶-۱-۲- کروماتوگرافی کاغذی (PC).....	۲۷
۷-۲- ترکیبات اسانس گیاهان دارویی.....	۲۸
۲-۷-۱- ترپن ها.....	۲۸
۲-۷-۱-۱- مونوترپن ها.....	۲۹
۲-۷-۱-۲- سزکوئی ترپن ها.....	۲۹
۲-۷-۱-۳- دی ترپن ها.....	۲۹
۲-۷-۱-۴- تری ترپن ها.....	۳۰
۲-۷-۱-۵- تترا ترپن ها.....	۳۰
۲-۷-۲- الکل ها.....	۳۰
۳-۷-۲- اسید ها.....	۳۱
۴-۷-۲- کتون ها.....	۳۱

۳۱	۵-۷-۲- آلدئید ها
۳۲	۶-۷-۲- استر ها
۳۲	۷-۷-۲- هیدرو کربن ها
۳۲	۸-۷-۲- لاکتون ها
۳۳	۸-۲- مکانیسم ضد میکروبی اسانس ها
۳۶	۹-۲- سنجش فعالیت ضد میکروبی اسانس ها در محیط آزمایشگاهی
۳۶	۱-۹-۲- معیار تعیین فعالیت ضد میکروبی اسانس ها
۳۷	۱-۲-۹-۲- روش دیسک دیفیوژن
۳۷	۲-۲-۹-۲- Agar Well روش
۳۷	۳-۲-۹-۲- روش رقیق سازی در محیط آگار
۴۰	۲-۱۱-۲- مورفولوژی و ویژگی ها
۴۱	۳-۱۱-۲- خصوصیات بیوشیمیایی استافیلوکوکوس اورئوس
۴۱	۴-۱۱-۲- سموم و آنزیم ها
۴۲	۵-۱۱-۲- انتروتوکسین های عامل اسهال و استفراغ استافیلوکوکی
۴۴	۸-۱۱-۲- ارتباط باکتری با مواد غذایی
۵۰	فصل سوم: روش پژوهش
۵۱	۱-۳- نوع مطالعه
۵۱	۱-۲-۳- مواد مصرفی
۵۱	۲-۲-۳- ابزار و دستگاه ها
۵۲	۳-۳- روش کار
۵۳	۱-۳-۳- تهیه گیاه و تایید علمی آن
۵۳	۲-۳-۳- روش تهیه اسانس و آنالیز آن
۵۶	۳-۳-۴- باکتری استافیلوکوکوس اورئوس مورد مطالعه

۵۷.....	۳-۳-۴- ارزیابی فعالیت ضد باکتریایی اسانس
۵۸.....	۳-۳-۵- روش شمارش میکروبی
۵۹.....	۳-۳-۶- تایید پرگنه های استافیلوکوکوس اورئوس
۵۹.....	۳-۳-۵- آماده سازی نمونه غذایی و انجام آزمون میکروبی
۶۰.....	۳-۳-۶- ارزیابی حسی
۶۱.....	۳-۷- تجزیه و تحلیل آماری
۶۱.....	۳-۸- مکان و زمان مطالعه
۶۱.....	۳-۹- محدودیت های پژوهش
۶۲.....	فصل چهارم: یافته ها
۶۳.....	۴-۱- نتایج آنالیز ترکیبات شیمیایی اسانس با استفاده از GC-MS
۶۳.....	۴-۲- نتایج بررسی فعالیت ضد باکتریایی اسانس در محیط کشت
۶۳.....	۴-۳- نتایج ارزیابی حسی اسانس
۶۸.....	۴-۴- نتایج بررسی تأثیر ضد باکتریایی اسانس در مدل غذایی
۶۹.....	فصل پنجم: بحث، نتیجه گیری و ارائه پیشنهادات
۷۰.....	۵-۱- بحث و نتیجه گیری
۷۵.....	۵-۲- نتیجه گیری کلی:
۷۷.....	فهرست منابع
۸۷.....	چکیده انگلیسی

فهرست جداول

صفحه

عنوان فهرست

- جدول ۱-۴- آنالیز ترکیبات اسانس خارمشک با استفاده از GC-MS* ۶۵
- جدول ۲-۴- حداقل غلظت ممانعت کنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) اسانس خارمشک ($\mu\text{g ml}^{-1}$) ۶۶
- جدول ۳-۴- شمارش باکتری استافیلوکوکوس اورئوس تحت تأثیر غلظت های مختلف اسانس خارمشک ۶۸

فهرست شکل ها و نمودارها

صفحه

عنوان فهرست

- شکل ۱-۲- موقعیت و مکانیسم های اثر اسانس ها در سلول باکتری ۳۵
- شکل ۱-۳- گیاه خشک شده (جمع آوری شده از کوه بینالود) ۵۴
- شکل ۲-۳- آسیاب برقی ۵۴
- شکل ۳-۳- ست کلونجر ۵۵
- شکل ۴-۳- دستگاه کروماتوگرافی (GC) ۵۵
- شکل ۵-۳- تجدید کشت باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در محیط کشت BHI Broth ۵۶
- شکل ۶-۳- کلنی های باکتری استافیلوکوکوس اورئوس رشد یافته در محیط کشت اختصاصی برد پارکر ۵۸
- شکل ۷-۳- نمایی از تیمارهای مورد مطالعه در مدل غذایی ۶۰
- شکل ۱-۴- منحنی کروماتوگرام آنالیز اسانس روغنی خارمشک ۶۴
- نمودار ۱-۴- میانگین پذیرش حسی سوپ جو حاوی غلظت های مختلف اسانس ۶۷
- شکل ۲-۴- تایید پرگنه های استافیلوکوکوس اورئوس با کشت محتویات داخل خانه های میکرو پلیت بر روی محیط کشت برد پارکر آگار ۶۷

فصل اول: مقدمه و بیان مسئله

۱-۱- بیان مسأله و اهمیت پژوهش

در گذشته بیشتر غذاها به طور مستقیم از منابع طبیعی تولید و مصرف می شد و اغلب بدون هزینه های جانبی به دست مصرف کننده می رسید، اما امروزه برای تهیه محصولات غذایی در کارخانه های صنایع غذایی از افزودنی های شیمیایی و مواد نگهدارنده ضد باکتریایی استفاده می شود (Russell and Gould 2003).

مواد نگهدارنده، مواد طبیعی یا مصنوعی هستند که آنها را به مواد غذایی، رنگ، نمونه های زیست محیطی، مواد دارویی و... اضافه می کنند تا این مواد را از فساد ناشی از رشد باکتری ها و تجزیه آن توسط میکروارگانیسم ها و یا فساد ناشی از تغییرات شیمیایی (از دست دادن کیفیت یا ارزش غذایی) محافظت نمایند (Prakash, Kedia et al. 2015).

استفاده از افزودنی های مصنوعی با خاصیت آنتی باکتریایی نیز عوارضی را به دنبال دارد. اگر چه در سال های اخیر به دلیل بالا رفتن سطح آگاهی، مصرف کنندگان خواهان کاهش افزودنی های مواد غذایی هستند، اما متخصصان با توجه به امکان زنده ماندن و تکثیر میکروب های بیماری زا در مواد غذایی معتقدند ترکیبات نگهدارنده ضد میکروبی، همراه با عملیات اجرایی مناسب، نقش مفیدی در تامین ایمنی مواد غذایی دارند (Prakash, Kedia et al. 2015).

زیان هایی نظیر سمیت و اثرات نامطلوب مواد نگهدارنده شیمیایی محققین را به دنبال کاهش استفاده از مواد شیمیایی مصنوعی و استفاده از مواد طبیعی برای نگهداری طولانی مدت مواد غذایی ترغیب نموده، تا بتوان از آنها به عنوان افزودنی های مجاز در صنعت غذایی استفاده کرد (Russell and Gould 2003).

مواد نگهدارنده طبیعی به تولید کنندگان غذا اجازه می دهند تا محصولات پایداری با برچسب های "Clean" یا "all-natural" که نشان دهنده طبیعی بودن همه اجزای ترکیبات است تولید کنند. تولید این محصولات با مشکلات و موانعی همراه است که شامل سطوح بالای استفاده از آنها، ایجاد طعم و رنگ نامطلوب و کاهش پایداری به دلیل کم بودن کارایی مواد ضد باکتریایی طبیعی است (Zare, Mahmoudi et al. 2011).

از خواص ترکیبات نگهدارنده ضد میکروبی علاوه بر تامین ایمنی می توان بر طولانی تر شدن عمر نگهداری مواد غذایی و کاهش ضایعات اشاره کرد (Russell and Gould 2003).

حضور میکروارگانیسم ها و به خصوص باکتری ها در مواد غذایی اهمیت فراوانی از نظر بهداشت و سلامت عمومی و همچنین از جهت کنترل کیفیت مواد غذایی برخوردار می باشد. میکروارگانیسم های بیماری زای موجود در مواد غذایی، هر ساله خسارات مالی و جانی فراوانی در جهان به وجود می آورند. علاوه بر این فساد مواد غذایی در اثر رشد میکروارگانیسم ها همچنان به عنوان یک معضل در صنعت غذایی به شمار می رود. یکی از راه های کنترل رشد باکتری های در مواد غذایی، استفاده از نگهدارنده ها و ترکیبات ضد میکروبی است. به منظور جلوگیری از رشد یا کشتن برخی میکروارگانیسم های مضر تا مدت ها از نگهدارنده های شیمیایی استفاده می شد. اما امروزه با توجه به افزایش سطح آگاهی و نگرانی های عمومی درخصوص عوارض نگهدارنده های شیمیایی، تمایل به مصرف محصولات فاقد نگهدارنده و یا با نگهدارنده طبیعی رو به افزایش اس. بنابراین در سال های اخیر مطالعات زیادی پیرامون نگهدارنده های طبیعی مانند اسانس ها و عصاره های گیاهی صورت گرفته است. عصاره ها و اسانس های گیاهان دارویی و اجزای تشکیل دهنده آنها دارای اثرات شناخته شده ضد باکتریایی می باشند (Holley and Patel 2005) (Cleveland, Montville et al. 2001).

امروزه به طور افزایشی تقاضای مصرف کننده برای محصولات طبیعی و با حداقل فرآوری افزایش یافته است به منظور برآوردن این احتیاج، یکی از چالشها در صنایع غذایی کاهش افزودنی های شیمیایی در فرمولاسیون مواد غذایی می باشد. در این مورد استفاده از محصولات گیاهی و طبیعی توجهات زیادی را به خود جلب کرده است، چون بسیاری از این محصولات ویژگی های عملکردی زیادی دارند. در میان ترکیبات ضد میکروبی طبیعی، اسانس ها به طور گسترده ای مورد مطالعه قرار گرفته اند اسانس ها دامنه عملکردی گسترده ای دارند بنابراین میکروارگانیسم های عامل فساد و آلودگی مواد غذایی و عوامل بیماریزای بعد از برداشت نسبت به این ترکیبات ضد میکروبی حساس هستند. یکی از روشهای جدید و موفقیت آمیزی که امروزه برای نگهداری مواد غذایی به کار می رود استفاده از فیلم ها یا پوشش های خوراکی تجزیه پذیر غنی از اسانس می باشد که از آن به عنوان نگهدارنده برای میوه، گوشت، ماهی و مانند آنها استفاده می شود. استفاده از مواد شیمیایی به منظور پیشگیری و به تعویق

انداختن فساد مواد غذایی امروزه در تکنولوژی صنایع غذایی کاربرد وسیعی دارد. در ارتباط با ایمنی مواد شیمیایی صنعتی درخصوص سرطان زایی و سمیت آنها برای انسان هنوز جای سوال وجود دارد. به این علت و همچنین به دلیل بالا رفتن سطح آگاهی مصرف کنندگان در سطح جامعه جهانی علاقه روز افزونی به استفاده از مواد نگهدارنده نظیر اسانس ها، عصاره ها و آنتی بیوتیک های طبیعی وجود دارد- (Sharafati) (Beuchat 2001) (Cleveland, Montville et al. 2001) chaleshtori, Rafieian-kopaei et al. 2012).

۱-۲- هدف اصلی

تعیین اثر ضد باکتریایی اسانس گیاه خارمشک بر استافیلوکوکوس اورئوس در محیط کشت آزمایشگاهی و مدل غذایی در دمای نگهداری یخچال

۱-۳- اهداف فرعی

- تعیین ترکیبات مؤثره شیمیایی اسانس گیاه خارمشک
- ارزیابی خاصیت ضد باکتریایی اسانس گیاه خارمشک علیه استافیلوکوکوس اورئوس در محیط کشت
- ارزیابی خاصیت ضد باکتریایی اسانس گیاه خارمشک علیه استافیلوکوکوس اورئوس در مدل غذایی
- ارزیابی افزایش مدت ماندگاری سوپ حاوی اسانس خارمشک در غلظت های مختلف

۱-۴- اهداف کاربردی

- استفاده از اسانس خارمشک جهت افزایش ماندگاری مواد غذایی.
- کاهش مسمومیت های غذایی با بکارگیری اسانس خارمشک به عنوان یک عامل ضد باکتریایی.
- جایگزینی نگهدارنده های طبیعی به جای نگهدارنده های شیمیایی و کاهش آسیب های ناشی از آن.

۱-۵- فرضیات پژوهش

- گیاه خارمشک بازده اسانس دارد.
- اسانس مذکور از فعالیت مهاری مناسبی علیه باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در محیط آزمایشگاهی برخوردار است.
- اسانس مذکور از فعالیت مهاری مناسبی علیه باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در مدل غذایی برخوردار است.
- اسانس خارمشک از افزایش مدت ماندگاری خوبی برای سوپ برخوردار است.

۱-۶- سوالات پژوهش

- ترکیبات موثره شیمیایی اسانس چه ترکیباتی هستند؟
- آیا توان فعالیت مهاری اسانس خارمشک علیه باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در محیط آزمایشگاهی مناسب است؟
- آیا توان فعالیت مهاری اسانس خارمشک علیه باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در محیط آزمایشگاهی مناسب است؟
- آیا اسانس خارمشک باعث افزایش ماندگاری سوپ خواهد شد؟

۱-۷- خارمشک

۱-۷-۱- معرفی گیاه

رده: دو لپه ای Classis: Dicotyledones

راسته: چتریان Order: Umbellales

تیره: چتریان Familia: Apiaceae

جنس: اکینوفورا Genus: Echinophora

گونه: اورینتالیس Species: Orientalis

نام فارسی: خارمشک و خوشاریزه

نام های محلی: فیاله، کراوی تیغ توراغ، خوشاروز و کشندری

خارمشک با نام علمی اکینوفورا (Echinophora) متشکل از ۱۰ گونه از منطقه مدیترانه به ایران و افغانستان توزیع شده (Georgiou, Koutsaviti et al. 2010).

جنس Echinophora در ایران ۴ گونه گیاه علفی چند ساله معطر دارد. دو گونه آن platyloba و cinerea در ایران هستند و دو گونه دیگر به نام های sibthorpiana و orientalis علاوه بر ایران در آناتولی، ارمنستان، روسیه، ترکمنستان، افغانستان، شبه جزیره بالکان، کرت، قبرس و سوریه نیز می رویند (Pass, Rashidipour et al. 2012).

Echinophora Orientalis یک گونه معمول از این جنس در ایران است (Entezari, Hashemi et al. 2009).

۱-۷-۲- ویژگی های گیاهی

گیاه خارمشک گیاهی پایا، سبز مات متمایل به زرد، محکم و خاردار، ساقه منفرد و از پایین منشعب، دارای شاخه های شیار دار ضخیم، محکم و سفت و بسیار منشعب با شاخکهای درهم شده است. که ارتفاع این گیاه به ۳۰ سانتی متر تا ۱۰۰ سانتی متر می رسد. این گیاه دارای گل های کوچک سفید یکپارچه، دوره گلدهی از ماه ژوئن تا جولای می باشد (Baniebrahim and Razavi 2013).

۱-۷-۳- ترکیبات موثره خارمشک

اسانس خارمشک دارای ترکیباتی از جمله:

۱. روغن های فرار

۲. فلاونوئید

۳. ساپونین: ساپونین ها یکی یا مجموعی از این ترکیبات است که آثار ضد قارچی گیاه را بر عهده دارد. ساپونین ها موادی با آثار سمی و همولیتیک هستند، ساپونین ها گلیکوزیدهای دارای پایه ترپنوئید و یا استرادیول با خصوصیات سطح فعال (surface active properties) هستند.

۴. آلکالوئید (Entezari, Hashemi et al. 2009).

۱-۷-۴- موارد مصرف

اندامهای هوایی این گیاه در اغلب نقاط بصورت تر و خشک جهت معطر کردن لبنیات (ماست و دوغ) مصرف می شود، عرق حاصل از این گیاه جهت معطر کردن محیط خانه و به عنوان ضد سردی مصرف می شود (Pass, Rashidipour et al. 2012).

در بعضی از نواحی استان خراسان رضوی مخصوصاً ارتفاعات نیشابور و تربت حیدریه به شکل خودرو رشد می کند. خارمشک در گذشته به شکل سنتی در نوشیدنی های لبنی به عنوان طعم دهنده مورد استفاده قرار می گرفته است (Asghari, Sajjadi et al. 2010).

اثرات ضد قارچی عصاره این گیاه روی قارچ هایی از جمله تریکوفایتون روبروم، میکروسپوریوم ژیسئوم، تریکوفایتون منتاگروفساتیس، اپیدرموفیتون فلوکسوزوم، میکروسپوریوم کنیس و کاندیدا آلیکنز به اثبات رسیده است (Pass, Rashidipour et al. 2012).

در مواد غذایی و ترشحات جهت جلوگیری از کپک زدن مواد غذایی کاربرد دارد که این خاصیت گیاه به آثار ضد قارچی آن بر می گردد (Moghaddam, Taheri et al. 2015).

۱-۷-۵- پراکنش جغرافیایی

خارمشک در ایران، آناتولی، ارمنستان، روسیه، ترکمنستان، افغانستان، شبه جزیره بالکان، کرت، قبرس و سوریه می رویند (Pass, Rashidipour et al. 2012).

در ایران پراکنش جغرافیایی خارمشک در دماوند، آملی، اراک، محلات، فارس، تربت حیدریه، رباط سفید، نیشابور، کرمانشاه و در استان کردستان در شهرستانهای سنندج، کامیاران و قروه در دامنه ارتفاعی ۲۰۰۰-۱۴۵۰ متر از سطح دریا رویش دارد (Asghari, Sajjadi et al. 2010).

۱-۷-۶- خواص درمانی خارمشک

❖ این گیاه مقوی معده، مدر و ضد سرطان است (Entezari, Hashemi et al. 2009).

❖ در طب عوام از آن به عنوان داروی ضد دل پیچه و اسهال استفاده می کردند (Avijgan, Hafizi et al. 2010).

❖ عصاره هیدروالکلی خارمشک بر روی درماتوفیت های عامل بیماری پوستی موثر است. بیماری های قارچی پوست، یکی از انواع بیماری ها هستند که سابقه کاربرد گیاهان دارویی برای درمان آن، از دیر باز بین

مردم ایران و جهان رایج بوده است. در واقع درماتوفیت‌های متعددی که در بیماری‌های پوست دخیل اند، لایه کراتینی پوست را گرفتار می‌کنند که به سختی قابل ریشه‌کنی هستند و این گیاه به علت داشتن آثار ضد قارچی خوب، می‌تواند در ساخت فراورده‌های دارویی ضد قارچی استفاده شود (Avijgan, Hafizi et al. 2010).

❖ اثر ضد اسپاسمی این گیاه بر روی انقباضات ایلئوم اثبات رسیده است (ایلئوم به قسمت انتهایی روده باریک انسان اطلاق می‌شود). حرکات مدور دستگاه گوارش عامل اصلی به جلو راندن محتویات دستگاه گوارش است که فعالیت آن توسط سیستم‌های عصبی کنترل می‌شود، افزایش بیش از حد انقباضات عضلات صاف دستگاه گوارش موجب دل‌درد و اسهال می‌شود، بنابراین می‌توان از خوشاریزه که حاوی اسانس و فلاونوئید است استفاده کرد که باعث کاهش این انقباضات می‌شود (Avijgan, Hafizi et al. 2010, Pass, Rashidipour et al. 2012).

❖ تأثیر عصاره گیاه خارمشک بر دیسمنوره اولیه (عادت ماهیانه) در کاهش درد (Delaram and Sadeghiyan 2010).

۱-۷-۷- تصاویر گیاه خارمشک



شکل ۱-۳- گیاه خارمشک (تهیه شده از دامنه های کوه بینالود نیشابور)

فصل دوم: بررسی متون

۲-۱- اسانس گیاهان دارویی

گیاهان دارویی^۴ به آن دسته از گیاهانی اطلاق می شوند که مواد مؤثره^۵ در اندامهای مختلفشان تولید و ذخیره می شوند که در درمان بیماری یا پیشگیری از بروز آن مورد استفاده قرار می گیرد. این مواد که کمتر از ۱٪ وزن خشک گیاه را تشکیل می دهد، دارای خواص دارویی مؤثر بر موجودات زنده است. مواد مؤثره، متابولیت های ثانویه ای هستند که در گیاهان وجود دارند و پس از استخراج و خالص سازی، می توانند در فرآورده های دارویی، آرایشی بهداشتی، غذایی و صنعتی کاربرد داشته باشند. مواد مؤثره گیاهان شامل آلکالوئیدها^۶، گلیکوزیدها^۷، روغن های فرار^۸ و سایر مواد مؤثره که شامل مواد تلخ، موسیلاژها^۹، فلاونوئیدها^{۱۰}، ویتامین ها^{۱۱}، تانن ها^{۱۲}، سیلیسیک اسید^{۱۳} و ترکیبات دیگر می باشند (Jalilvand, Vakili et al. 2011).

کلمه اسانس از ریشه یونانی essential به معنای ذاتی، اصلی یا ضروری گرفته شده است. اسانس های روغنی یا essential oils که روغن های اتری یا روغن های فرار نیز نامیده می شوند، ترکیبات معطری هستند که از گل - ها، دانه ها، جوانه ها، برگ ها، شکوفه ها، شاخه های کوچک، پوست، ریشه، میوه و حتی کلالة و خامه گل ها گرفته می شوند (Bullerman, Lieu et al. 1977) (Jaimand and Rezaee 2003).

اسانس ها ترکیباتی معطر و بطور دقیق تر روغن های فرار و بی رنگ با منشأ ترپنی، الکلی و ... می باشند. این ترکیبات دارای بوی بسیار قوی هستند. در دمای محیط در مجاورت هوا تبخیر می شوند. رنگ اکثر اسانس ها وقتی خالص و تازه هستند بیرنگ می باشد اما با گذشت زمان بدلیل اکسیداسیون و رزینی شدن، رنگ آنها تیره می شود. به همین دلیل باید اسانس ها در ظروف مقاوم به ورود و خروج هوا و در جای خشک و تاریک نگهداری شوند.

-
4. Medicinal plants
 5. Effect substance
 6. Alkaloids
 7. Glycosides
 8. Essential Oils
 9. Mucilage
 10. Flavonoids
 11. Vitamins
 12. Tannins
 13. Silicic acid

اسانس ها به طور معمول دارای وزن مخصوص کمتر از آب هستند. اسانس ها در برخی بافت های گیاهی مانند مرکز سلول یا در محل ذخیره اسانس زیر پوشش کرکی، غده های کوچک یا در فضای میان سلولی جمع می شوند. این ترکیبات ممکن است به طور مستقیم توسط پروتوپلاسم، بوسیله تجزیه مواد رزینی غشای سلول ها یا از هیدولیز بعضی از گلیکوزید ها حاصل شوند (Burt 2004).

آثار درمانی و موارد استفاده گیاهان دارویی برکسی پوشیده نیست. بازگشت بسوی طبیعت و استفاده مجدد از داروهایی که منشأ گیاهی و طبیعی دارند، در شرایطی صورت می گیرد که انسان امروزی با تقویت و تبلیغ به مصرف هرچه بیشتر داروهای شیمیایی، خود را با عوارض جانبی سوء این داروها مواجه نموده است (Hatami 2002).

خواص ضد میکروبی اسانس ها سال هاست که شناخته شده است. در کنار خاصیت ضد میکروبی، اسانس ها دارای اثرات ضد قارچی، ضد ویروسی، ضد انگلی و ... نیز می باشند. با وجود شناخت این اثرات در سالها قبل، جنبش مصرف کننده سبز منجر به تمایل بیشتر برای شناخت علمی این مواد شده است (Cowan 1999).

اگرچه مصرف گیاهان دارویی با توسعه صنایع شیمیایی محدود شده است، اما چشم انداز میزان استفاده از این گیاهان روبه افزایش است. تحقیقات علمی، اثربخشی و ایمنی تعدادی از روشهای طب مکمل از جمله گیاهان دارویی را در درمان برخی بیماری ها به اثبات رسانده است. آمارهای منتشره جهانی نشان دهنده این است که با وجود پیشرفت های جدید در علوم شیمی و داروسازی و عرضه مواد مصنوعی مشابه مواد مؤثره گیاهی، نه تنها از میزان کشت و تولید گیاهان دارویی کاسته نشده، بلکه تولید و مصرف آنها نیز افزایش یافته است (Pirbalouti, 2010).

جایگاه استفاده از گیاهان دارویی در باور و فرهنگ مردم و گرایش روزافزون جهانی به استفاده از ترکیبات طبیعی، از جمله نقاط قوت و فرصت های پیش روی در زمینه گیاهان دارویی می باشد. اسانس ها و دیگر مواد مؤثر گیاهان دارویی زمینه ای بسیار مناسب برای صادرات دارند و در ارتقاء ارزش افزوده حاصله از کشت گیاهان دارویی دارای اهمیت به سزایی می باشند. اسانس ها از جمله مواد لازم در صنایع دارویی، غذایی و آرایشی و بهداشتی هستند و بر

اساس یک توافق جهانی و به دلیل زیست محیطی و بهداشتی مصرف اسانس ها و رنگهای شیمیایی ابتدا در تهیه مواد غذایی و بعد تولید مواد آرایشی به تدریج کاهش یافته است و به جای آنها اسانس ها و رنگهای طبیعی بکار گرفته می‌شود. کشور های مصرف کننده مانند ایران دارای گیاهانی هستند که اسانس ها بر بنیاد آنها شکل می‌گیرد و با توجه به قابلیت های گسترده سرزمین گونه های گیاهی، می‌توان علاوه بر جلوگیری از خروج مبالغ زیادی ارز از کشور در زمره صادرکنندگان اسانس قرار گرفت.

۲-۲- اهمیت استفاده از اسانس گیاهان دارویی

به علت افزایش سریع جمعیت و نیاز وافر به تهیه مواد غذایی در ابعاد گسترده صنعت و تکنولوژی مواد غذایی پیشرفت روزافزون داشته و کم کم آشپزخانه های منازل جای خود را به کارگاه ها و کارخانه های بزرگ تولید مواد غذایی می دهند. همین امر باعث شده که از انواع مختلف مواد شیمیایی به منظور حفاظت و خوب جلوه دادن مواد غذایی بهره گیری شود. یک گروه عمده از این مواد شیمیایی که حائز اهمیت هستند رنگ های خوراکی و اسانس هائی هستند که به مواد غذایی افزوده می شوند (Bozin, Mimica-Dukic et al. 2006).

اسانس های گیاهی دارای ترکیبات خاصی هستند که می توانند باعث حذف یا کاهش رشد باکتریها، مخمرها و قارچ های عامل فساد شوند و از تولید توکسین توسط آنها جلوگیری کنند (Botsoglou, Christaki et al. 2002) (Celiktas, Kocabas et al. 2007) (Hussain, Anwar et al. 2008).

اثرات مضر و سرطان زایی نگهدارنده های غذایی شیمیایی و سنتتیک باعث افزایش تمایل به استفاده کمتر از افزودنی های غذایی سنتتیک و علاقه فراوان برای استفاده از مواد ضد میکروبی طبیعی تحت عنوان جنبش مصرف کننده سبز^{۱۴} برای رسیدن به غذای سالم با استفاده از روش های جدید و طبیعی فراهم کرده است؛ که یکی از این روش ها به کارگیری اسانس ها یا روغن های اساسی^{۱۵} می‌باشد (Liggins and Burt 2004).

14 Green consumerism

15 Essential oils

اسانس ها حتی به عنوان ضد ویروس، ضد قارچ، ضد انگل و ضد حشرات، ماده بیهوشی، مکمل غذایی، طعم دهنده در غذاها و در عطرها به عنوان خوشبو کننده (Burt 2004)، آنتی اکسیدان و ضد سرطان استفاده می شوند (Amirghofran, Bahmani et al. 2005). اسانس های روغنی از نظر سازمان غذا و داروی آمریکا FDI شناخته شده GRAS^{۱۶} به عنوان افزودنی بی خطر اند (Burt 2004).

۲-۳- تاریخچه استفاده از اسانس ها

تاریخچه پزشکی و درمان در ایران به دوران آریایی، در حدود ۷۰۰۰ سال قبل از میلاد مسیح بر می گردد و نیز نخستین نوشته ها و نسخه های به دست آمده از گیاهان دارویی در تمدن های مهم دنیا نظیر ایران باستان، مصر، خاورمیانه، یونان باستان، هند و چین به ۳۰۰۰ سال قبل از میلاد بر می گردد. مصریان ۴۵۰۰ سال پیش از میلاد از عصاره گیاهان معطر مانند گل رز، برگ درخت سدر و موارد مشابه دیگر برای مصارف آرایشی و طبی و مناسک مذهبی و آئین ها استفاده می کردند. اسناد به دست آمده نشان می دهد که مصریان ۴ قرن پیش از میلاد برای مومیایی کردن فراعنه از این اسانس ها استفاده می کردند. مومیایگران بعد از خارج نمودن احشاء بدن، شکم مرده را از اسانس های سیر، دارچین و مواد معطر دیگر پر می کردند. در کشور چین استفاده از گیاهان دارویی و مواد طبیعی قدمت چند هزار ساله دارد و از مواد روغنی در گیاه درمانی و مراسم مذهبی و سستی استفاده می کردند. در هند باستان، گیاهان معطر و خوشبو در زندگی روزمره و مراسم مذهبی بخصوص از عطر گل های رز و یاسمن و بخور صندل در معابد و مکان های مقدس استفاده می کردند (Zargari 1994) (Zarshenas 2016).

اسناد و شواهد تاریخی بسیاری گواه این واقعیت است که ایران از جمله کهن ترین تمدن های بشری است که با گیاهان دارویی آشنایی داشته و ایرانیان از جمله مردمانی هستند که سرشار از تجربه های ارزشمند در زمینه استفاده از گیاهان دارویی می باشند. "سریتا" که از او در اوستا نیز نام برده شده، فردی ایرانی است که از او به عنوان اولین پزشک در جهان یاد می شود. "اهورا مزدا" ده هزار گیاه شفا بخش در اختیار او گذاشت تا به مداوای مردمان بپردازد (Sirajuddin 2000).

16 Generally recognized as safe

ابو علی سینا طبیب مشهور ایرانی نیز با بسیاری از گیاهان دارویی آشنایی داشته و با بهره مندی از خواص درمانی آنها بسیاری از بیماران خود را مداوا نموده است. کتاب های پزشکی این دانشمند برجسته هنوز یکی از مهمترین مراجع و مأخذ معتبر پزشکی در جهان به شمار می آید. در بررسی گونه های گیاهی واژه "persica" در کنار نام علمی بسیاری از گونه ها دیده می شود که معرف ایرانی بودن آن گیاه است (Sirajuddin 2000).

گفته می شود که حدود ۸۰۰-۷۵۰۰ گونه گیاهی در ایران وجود دارد که از این تعداد بیش از ۲۰۰ گونه دارای ارزش دارویی و اقتصادی هستند. در عین حال تعداد گیاهانی که در طب سنتی استفاده می شود بیش از صد ها مورد است (Zargari 1994).

پس از تحول عظیمی که با آثار توسط بقراط پدر علم طب و شاگردش جالینوس طی سال های ۲۰۰ تا ۴۶۰ سال قبل از میلاد مسیح رخ داد، روش های درمانی بر اساس طب مزاجی جایگزین سحر و جادو و خرافات شد. برخی از دانشمندان و نویسندگان معتقدند که این تحول بزرگ در یونان باستان الهام گرفته از طب ایران باستان بوده است و مکتب طبی زرتشت خیلی زودتر از طب یونانی به وجود آمده بود. آن گونه که جنگ های میان ایرانیان و یونانیان منجر شد تا آثار طبی بقراط و سایر دانشمندان به دست ایرانیان بیفتد و اولین مدرسه به نام جندی شاپور تاسیس شود. پس از ورود سپاه اسلام به ایران، این مدرسه به عنوان بزرگ ترین مرکز تعلیم پزشکی در سر تاسر ممالک اسلامی درآمد (Zargari 1994).

در این زمان که یکی از طلائئ ترین ادوار علم پزشکی در ایران است. دانشمندان بزرگی چون "ابوریحان بیرونی، زکریای رازی و ابوعلی سینا" پا به عرصه گذاشتند. آن ها توانستند در مدت کوتاهی، پیشرفت های چشم گیری، در جهان طب به وجود آورند (Sirajuddin 2000).

کتاب قانون یکی از معروف ترین آثار پزشکی دنیا، از ارزشمندترین منابع قدیمی طب سنتی است که ابوعلی سینا پزشک و فیلسوف ایرانی آن را به رشته تحریر در آورد. او در این اثر گران بها ۸۱۱ داروی گیاهی و خواص مهم درمانی آن ها را معرفی کرده است. با کمال افتخار در حال حاضر اثر این دانشمند بزرگ ایران زمین به عنوان یکی از منابع مهم در دانشگاه های پزشکی سراسر دنیا، مورد تدریس و مطالعه قرار می گیرد (Sirajuddin 2000).

اسانس ها تقریباً از قرن سیزدهم تولید و عرضه می شده است ولی استفاده از آنها تا قرن ۱۶ به صورت وسیع در نیامده بود. نام Essential Oil در قرن ۱۶ توسط فرد سوئیس به نام Paracelsus Von Hohenheim ایجاد شد که آن را از نام ترکیب موثر داروی Quinta essentia برگرفت. نخستین بار Delacroix در سال ۱۸۸۱ اولین اندازه گیری جهت تعیین خواص ضد میکروبی اسانس ها را انجام داد. سرانجام در قرن ۱۹ و ۲۰ استفاده از خواص طعمی و بویی اسانس ها بر مصارف پزشکی آنها ارجحیت یافت (Burt 2004).

وسعت و تنوع آب و هوایی در کشورهای ایران، چین و هند منجر شده است تا این مناطق از لحاظ تعداد و تنوع گونه های ارزشمند دارویی در دنیا از جایگاه خاصی برخوردار باشند به گونه ای که تا کنون صدها گونه گیاه دارویی با خواص بسیار موثر نظیر گیاهان دارویی و گیاهان ادویه ای مانند فلفل سیاه، شاه دانه، زعفران، زیره، شیرین بیان، خشخاش، جوز هندی، کرچک، کنجد، آلوئوورا یا صبر زرد، جین سینگ چینی، چای چینی و ... را به دنیای امروز معرفی کرده اند (Iravani and Jaberalansar 2003).

در ایران که یکی از هفت کشور آسیایی است که بیشترین گیاهان دارویی را دارد این گرایش وجود داشته است و در سه دهه گذشته شاهد روند رو به رشد مردم در زمینه استفاده از این دارو های گیاهی و احیای طب سنتی هستیم. براساس آمار موجود در کشورمان نیز بیش از ۱۳۰ نوع داروی گیاهی وجود دارد (Bahraminejad, Abbasi et al. 2011).

امروزه تخمین زده می شود که ۷۵ هزار گیاه دارویی در سراسر جهان وجود داشته باشد و تاکنون ۵۰۰۰ داروی گیاهی توسط صنایع دارویی جهان ساخته و به بازار عرضه می شود. این بخش از منابع طبیعی قدمتی همپای بشر دارند و یکی از مهمترین منابع تامین غذایی و دارویی بشر در طول نسل ها بوده اند (Bahraminejad, Abbasi et al. 2011).

طبق برآوردها در حال حاضر ۷۵۰ هزار گیاه گل دار یا دانه دار در زمین یافت می شود و تاکنون ۳۰۰ هزار گیاه در جهان شناسایی شده اند. قاره آمریکا با دارا بودن ۱۳۸ هزار گونه گیاهی از جمله منابع غنی گیاهان در جهان است و این در حالی است که قاره آسیا دارای ۱۲۳ هزار گونه گیاهی است. در بین کشورهای آسیایی بیشترین تعداد و تنوع

گونه ها متعلق به کشور های چین، اندونزی، هند، برمه، تایلند، مالزی و ایران است. در حال حاضر استفاده از گیاهان دارویی در موارد مختلف همچون طب کنونی، طب سنتی یا بهتر بگوییم طب مزاجی یا طب اخلاطی کاربرد دارند (Sirajuddin 2000).

اسانس ها و دیگر مواد مؤثر گیاهان دارویی زمینه ای بسیار مناسب برای صادرات دارند و در ارتقاء ارزش افزوده حاصله از کشت گیاهان دارویی دارای اهمیت به سزایی می باشند. اسانس ها از جمله مواد لازم در صنایع دارویی، غذایی و آرایشی و بهداشتی هستند و بر اساس یک توافق جهانی و به دلیل زیست محیطی و بهداشتی مصرف اسانس ها و رنگهای شیمیایی ابتدا در تهیه مواد غذایی و بعد تولید مواد آرایشی به تدریج کاهش یافته و به جای آنها اسانس ها و رنگهای طبیعی بکار گرفته می شود. کشور های مصرف کننده مانند ایران دارای گیاهانی هستند که اسانس ها بر بنیاد آنها شکل می گیرد و با توجه به قابلیت های گسترده سرزمین گونه های گیاهی، می توان علاوه بر جلوگیری از خروج مبالغ زیادی ارز از کشور در زمره صادرکنندگان اسانس قرار گرفت.

۲-۴- کاربرد اسانس گیاهان دارویی

گیاهان دارویی در حیطه های مختلف پزشکی، صنعت، کشاورزی، غذا و ... کاربرد های بسیاری دارند. در حیطه پزشکی (بهداشت و درمان) امید بسیاری از محققان برای درمان انواع سرطانها به گیاهان دارویی است. در صنعت نیز انواع مختلف گیاهان دارویی به کار گرفته می شوند. مثلاً امروزه ساخت انواع آفت کشهای نباتی در دستور کار مبارزه با آفات قرار دارد و یا انواع اسانس های گیاهی که در صنایع غذایی، آرایشی، بهداشتی و ... به کار می روند. حتی در بخش تغذیه دام و طیور نیز گیاهان دارویی کاربرد دارند. کاربرد گیاهان دارویی در صنایع داروسازی از اهمیت ویژه ای برخوردار است. در این صنایع گیاهان دارویی به صورت تازه یا خشک مورد استفاده قرار می گیرند (Burt 2004).

اسانس ها به دلیل معطر بودن و داشتن طعم های مشخص در صنایع غذایی، عطرسازی و لوازم آرایشی، داروسازی و بطور کلی در صنایعی که محصولات معطر و یا دارای طعم خاص تولید می کنند، مورد مصرف دارند. همانطور که

گفته شد، اسانس ها دارای ترکیبات شیمیایی متنوع و پیچیده ای هستند و به همین دلیل نمی توان خصوصیات دارویی مشترکی را برای آنها ذکر کرد (Zargari 1994).

گیاهان دارویی و بویژه برخی از مواد مؤثره آنها نظیر اسانس ها علاوه بر کاربردهای ذکر شده در فعالیتهای کشاورزی نیز اهمیت خاصی دارند. به عنوان مثال برخی از اسانس های گیاهی دارای خواص حشره کش، ضد آفات، ضد قارچ و بعضاً ضد اکسیدان می باشند. با توجه به این مسئله که استفاده از آفت کش های نباتی عوارض سوئی برای انسان و محیط زیست ندارد و از طرفی مخاطراتی که آفت کشهای شیمیایی و سموم صنعتی بر جا می گذارد، لذا توسعه آفت کشهای نباتی مورد توجه جهانیان واقع شده است. ضمن اینکه این سموم، مقاومت کمتری را در حشرات و آفات سبب می شوند و در نتیجه اثر و کارایی بیشتری خواهند داشت. استفاده از عصاره ها و ترکیبات گیاهان معطر به عنوان آنتی اکسیدان در صنایع غذایی نیز در حال توسعه است. عصاره گیاه رزماری در برخی شرکتهای به عنوان ماده ضد اکسیدان به کار می رود. ترکیبات ضد اکسیدان علاوه بر جلوگیری از فساد مواد غذایی، اثرات مفیدی نیز بر عملکرد بدن دارند (Burt 2004) (Jafarzadeh, Aghazadeh et al. 2010).

اگر چه گیاهان معطر عمدتاً در مصارف غذایی، آرایشی و بهداشتی بکار می روند اما چنانچه طی آزمایشات و تحقیقات علمی، خواص و اثرات دارویی نیز برای آنها ثابت شود، در زمره گیاهان دارویی قرار می گیرند. استفاده از گیاهان معطر به عنوان دم کردنی های گیاهی، ادویه و چاشنی های غذایی و همچنین منبع تهیه انواع اسانس ها و عصاره ها از دیرباز رایج و مرسوم بوده است و در حال حاضر از جایگاه مهمی در صنایع غذایی و آرایشی بهداشتی برخوردارند. تحقیقات سازمان بهداشت جهانی نشان می دهد که بیش از ۸۰٪ جمعیت جهان بویژه در کشورهای در حال توسعه و مناطق دور افتاده که فاقد امکانات بهداشتی و رفاهی مناسب و جدید هستند، از گیاهان دارویی و ذخایر غنی طب سنتی و طب گیاهی بومی به منظور رفع نیازهای اولیه بهداشتی و درمانی خود بهره می گیرند. خوشبختانه طی دهه های گذشته، نگاه جوامع به گیاهان دارویی و اثرات شفا بخش آنها کاملاً تغییر کرده و به نوعی می توان رویکرد مجدد جوامع صنعتی به گیاهان دارویی و داروهای گیاهی را مشاهده کرد (Sirajuddin 2000) (Zarshenas 2016) (Zargari 1994).

۲-۵- استخراج اسانس گیاهان دارویی

روش های مختلفی برای تهیه اسانس های گیاهی استفاده می شود که با توجه به نوع و حالت گیاه، مواد موثر ذخیره و سرانجام درجه خلوص محصول نهایی روش استخراج متفاوت می باشد (Zargari 1994).

۲-۵-۱- تقطیر

تقطیر^{۱۷} عبارت است از تبدیل بخارات آب به قطرات آب که این تغییر و تحول تحت تاثیر جریان هوای سرد صورت می پذیرد. تقطیر یکی از قدیمی ترین روش های تبدیل بخار آب به مایع است.

۲-۵-۱-۱- تقطیر با آب

این روش ساده ترین و ارزاترین روش است و به عنوان روش بهینه برای تولید اسانس در ایران انتخاب شده است (Choobkar, Soltani et al. 2010).

در این روش مواد را در آب غوطه ور می کنند و مخلوط را می جوشانند. بخار آب به همراه بخار روغن از دیگ خارج شده و در کندانسور^{۱۸} تبدیل به مایع می شود و سپس در جدا کننده مکانیکی این دو مایع از هم جدا می شوند. مواد گیاهی در طول فرآیند استخراج باید همیشه در آب غوطه ور باشند لذا آب تبخیر شده باید جایگزین شود. این روش برای استخراج روغن از گل ها و پودر ها استفاده می شود (Khajenoori, Asl et al. 2013) (Feyzi and maghadam 2013).

در این روش دمای تقطیر در حدود ۱۰۰ درجه سانتیگراد و فشار اتمسفریک است. از معایب این روش تماس مواد گیاهی و اسانس های روغنی با دیواره گرم دیگ است که دمایی بالاتر از ۱۰۰ درجه سانتیگراد دارد که باعث اکسید شدن اسانس ها یا هیدرو لیز استر های همراه اسانس و تخریب ساختار مولکولی روغن های مجاور دیواره می شود. دمای جوش اسانس های روغنی بین ۱۵۰-۳۰۰ درجه سانتیگراد است. مدت زمان تقطیر به مواد حاوی روغن

17. Distillation

18. condenser

و خواص اسانس استخراج شده بستگی دارد ولی معمولاً در حدود سه ساعت است. طولانی شدن مدت زمان تقطیر در صد تولید را اندکی افزایش می دهد ولی باعث تخریب ساختمان مولکولی اسانس ها و اکسید شدن آنها می شود. از طرفی درصد روغن های با دمای جوش بالا و سنگین را که نامطلوب هستند افزایش می دهد. میزان تولید و بازده این روش به حلالیت آب نیز وابسته است و ممکن است به علت هیدرولیز شدن استر ها در مجاور دیواره محصول نهایی عاری از استر باشد. از معایب بزرگ این روش انحلال اسانس ها در آب است که باعث از دست رفتن مقداری از اسانس ها می شود که جدا سازی آن ها از آب دشوار است. این روش به مصرف و به کار گیری مقدار زیادی آب می پردازد که سرعت آماده سازی پس از هر بار تخلیه را کاهش می دهد (Pirbalouti, Malekpoor et al. 2012) (Zargari 1994).

۲-۵-۱-۲- تقطیر با بخار^{۱۹}

متداول ترین روش تولید اسانس ها در صنعت، روش تقطیر با بخار آب (Steam-distillation) است (Burt 2004).

غالباً به کمک تقطیر با بخار آب می توان ترکیبات آلی فراری را که با آب مخلوط نمی شوند یا تقریباً با آن غیر قابل اختلاط هستند تفکیک و تخلیص کرد. در این روش مخلوط آب و جسم آلی با هم تقطیر می شوند (Jaimand and Rezaee 2003).

معمولاً از روش تقطیر با بخار مستقیم جهت استخراج اسانس از اندام تازه گیاهان استفاده می کنند. بنابراین سرشاخه های گلدار گیاه را پس از جمع آوری و آماده سازی داخل محفظه مخصوص گیاه در دستگاه تقطیر قرار داده می شود. اسانس بدین وسیله همراه با بخار آب در قسمت سرد کننده جمع می شود. در این روش فشار بخار با شدت زیاد به داخل بافتها و سلولهای گیاهی نفوذ می کند در این روش تجزیه ترکیبهای اسانس به حداقل ممکن می رسد (Jaimand and Rezaee 2003).

تقطیر با بخار به دو صورت امکان پذیر است:

۱. روش مستقیم: مخلوط آب و ماده آلی با همدیگر حرارت داده می شوند (تقطیر بوسیله آب).

۲. روش غیر مستقیم: که بخار آب را در ظرف دیگری ایجاد کرده و از داخل ماده آلی عبور می دهند.

مزیت استفاده از تقطیر با بخار آب در این است که درجه حرارت در این تقطیر نسبتاً پایین است (کمتر از ۱۰۰ درجه سانتیگراد) و این روش برای خالص سازی موادی به کار می رود که نسبت به حرارت حساسند و در حرارتهای بالا تجزیه می شوند. همچنین این روش برای جدا کردن ترکیب، از مخلوط واکنشی که محتوی مقدار زیادی از مواد قیر مانند باشد مفید است (Jaimand and Rezaee 2003).

۲-۵-۱-۳- تقطیر با آب و بخار^{۲۰}

در مورد گیاهان خشک و تازه به کار می رود که در اثر جوشیدن فاسد نمی شوند. در این روش ابتدا مواد گیاهی را آسیاب کرده و با آب مخلوط می نمایند. به طوریکه داخل آب قرار گیرند سپس جریان بخار را از داخل مواد خیس شده عبور می دهند (Jaimand and Rezaee 2003) (Feyzi and maghadam 2013).

۲-۵-۲- فشردن

این روش شامل فشار دادن ساده پوست میوه در ۱۲۰ درجه فارنهایت تا استخراج روغن است. پوست از میوه جدا می شود و سپس فشرده می شود و در نتیجه مخلوطی آبکی از اسانس و مایعی که در زمان پرس از آن خارج می شود بدست آید که اگر وجود داشته باشد در حالت اصلی روغن تغییر به وجود می آید. این روش در مورد اسانس هایی به کار می رود که در اثر تقطیر تجزیه می شوند مانند استخراج اسانس از پوست مرکباتی چون پرتقال، لیمو، ترنج و گریپ فروت استفاده می شود. اسانس به دست آمده در این روش به دلیل عمر کوتاهی که دارد بیشتر از ۶ ماه قابل استفاده نیست (Zargari 1994).

۲-۵-۳- استخراج به کمک حلال

در این روش گیاه ها در محفظه استخراج و در کنار حلال های نفتی و فرار از جمله اتر و هگزانول قرار داده می شوند تا حلال در آنها نفوذ کرده و روغن را در خود حل کند، سپس حلال به داخل تبخیر کننده پمپ می شود و در آنجا توسط ایجاد خلا تبخیر شده و جدا می شود. این روش هم گران است و از طرفی به علت استفاده از حلال های فرار خطرناک است. روش استخراج با حلال دارای معایبی از قبیل سمیت حلال در برخی از موارد، مصرف زیاد حلال، قابل احتراق بودن حلال ها و مهمترین عامل باقی ماندن حلال در محصول نهایی است. از این روش در مواردی استفاده می شود مواردی که اسانس موجود در بافت های تازه گیاه به اندازه های کم موجود است و استخراج اسانس به طرق دیگر مشکل بوده و یا امکان پذیر نیست (Zargari 1994).

مهمترین مزیت این روش درجه حرارت مناسب و ملایم (۵۰ درجه سانتی گراد) است. در این روش یک حلال هیدروکربنی به مواد گیاهی اضافه می شود تا به حل شدن اسانس روغنی کمک کند. زمانی که محلول فیلتر می شود و به وسیله تقطیر تغلیظ می شود، مواد حاوی رزین یا ترکیبی از موم و اسانس باقی می ماند. برای استخراج روغن از الکل خالص استفاده می شود و در نهایت با تبخیر الکل روغن باقی می ماند. این روش به عنوان بهترین روش برای استخراج در نظر گرفته شده است زیرا احتمال باقی ماندن مقدار کمی از حلال وجود دارد که می تواند باعث آلرژی یا تحریک سیستم ایمنی بدن، در موارد دارویی و درمانی بشود (Zargari 1994).

۲-۵-۴- استخراج به کمک گازها

روش نوینی که امروزه مورد توجه صنایع غذایی، دارویی و آرایشی قرار گرفته است، استخراج با گاز دی اکسید کربن به عنوان یک حلال می باشد. این روش دارای محاسنی است که روش های فوق الذکر از آن بی بهره اند (Zargari 1994).

شرایط استخراج با CO_2 شامل دمای ۳۵ و ۵۵ درجه فارنهایت است که CO_2 با فشاری در حدود ۱۰۰۰ PSI از میان مواد گیاهی عبور داده می شود که تحت این شرایط دی اکسید کربن به مایع تبدیل می شود (Zargari 1994).

روش CO_2 فوق بحرانی یکی از روش های جدید است که اصول آن بر پایه میعان CO_2 درحالی نقطه بحرانی است. دی اکسید کربن به حالت مایع قادر است مواد معطر را در خود حل کند و در حالت گازی تشکیل ۲ فاز دهد. در روش استخراج با CO_2 ، پفوق بحرانی، CO_2 تا دمای ۸۷ درجه فارنهایت حرارت داده می شود که به فشار ۲۸۰۰۰ PSI می رسد که در این شرایط دی اکسید کربن به بخار یا مه تبدیل می شود. با آزاد کردن و برداشتن فشار، دی اکسید کربن به حالت فرار درآمده و اسانس باقی می ماند. نکته مهم در استفاده از این روش استفاده از فشار کم و درجه حرارت پایین است. درجه حرارت بالا و استفاده از حلال ساختار مولکولی آن را تغییر داده و ارزش درمانی اسانس را تغییر داده یا نابود می کند (Zargari 1994).

از جمله محاسن آن اینکه دی اکسید کربن حلالی غیر سمی و بدون رنگ و بو است و جالب تر اینکه در این فرآیند، دی اکسید کربن در محصول نهایی باقی نمی ماند. دی اکسید کربن غیر قابل احتراق بوده و بسیار نفوذ پذیر است. به علت اینکه این فرآیند در دمای پایین صورت می گیرد، اثرات تخریب حرارتی موجود در روش تقطیر را ندارد و چون از آب استفاده نمی شود، اثرات منفی ناشی از حضور بخار آب نیز وجود ندارد. بنابراین یک محصول آروماتیکی طبیعی و خالص و عاری از اثرات حرارتی و آب و عاری از حلال از این روش به دست می آید. همچنین دی اکسید کربن به آسانی در دسترس بوده و ارزان قیمت می باشد. در این روش دی اکسید کربن، به راحتی از محصول نهایی حذف می گردد، بنابراین عیب بزرگ دیگر حلال های شیمیایی یعنی باقی ماندگی در محصول را ندارد و از طرفی محصول استخراج شده در این فرآیند شباهت بیشتری با عطر گیاه اولیه ای که به عنوان خوراک برای سیستم مورد استفاده قرار می گیرد دارد تا محصولاتی که از روش های دیگر استخراج حاصل شده اند. دی اکسید کربن فوق بحرانی استخراج کننده بهتری نسبت به دی اکسید کربن مایع می باشد. در ناحیه فوق بحرانی حلالی به دست می آید که از نظر ضریب نفوذ شبیه به گاز و از نظر دانسیته شبیه به مایع است و مزایای هر دو فاز را در خود گرد آورده است. دی اکسید کربن نسبت به حلال های دیگر مانند اتانول و هگزان گزینش گری بهتری از خود نشان می دهد.

مزیت بزرگ این روش کنترل حلالیت با فشار می باشد و بنابراین با تنظیم شرایط می توان ترکیبات متفاوتی را جداسازی نمود و از این روش در گستره وسیعی استفاده کرد. محصولات حاصل از این روش مجموعه ای از ترکیبات و مواد مختلف می باشند. تفکیک این مجموعه به وسیله روش افت فشار جزء به جزء پیشنهاد گردیده است (Zargari 1994).

از معایب این روش می توان به بازده پایین، هزینه بسیار بالا، از دست رفتن ترکیبات فرار، زمان طولانی تهیه اسانس و ایجاد ترکیبات با طعم نامطبوع اشاره کرد. البته اسانس های استخراج شده به وسیله دی اکسید کربن فعالیت ضد میکروبی بیشتری نسبت به اسانس های بدست آمده از روش تقطیر دارند (Burt 2004).

۲-۶- آنالیز اسانس گیاهان دارویی

آنالیز دقیق و نهایی اجزای تشکیل دهنده اسانس ها با روش های کروماتوگرافی گازی و اسپکترومتری توده ای بدست می آید. اسانس ها می توانند شامل بیش از ۶۰ جزء باشند. جزء اصلی گاهی تا ۸۵٪ اسانس را شامل می شود درحالی که سایر ترکیبات در مقادیر اندک وجود دارند اسانس خالص مخلوطی بیش از ۲۰۰ ترکیب هستند به طور معمول شامل ترین ها یا مشتقات فنیل پروپانیک هستند (Russo, Galletti et al. 1998).

آنالیز اسانس های روغنی بسیار مشکل است. زیرا یک اسانس از صد ها ترکیب تشکیل شده است. کروماتوگرافی گازی معمولاً برای جداسازی ترکیبات فرار و طیف سنج جرمی برای تعیین ساختار شیمیایی استفاده می شود. مواد قطبی و غیرقطبی هر دو می توانند به عنوان فاز مایع ستون کروماتوگرافی استفاده شوند. ایزومر های نوری در اسانس های روغنی به دو فرم راست گردان و چپ گردان و همچنین مخلوط آنها وجود دارد (Daferera, Ziogas et al. 2000).

روش کروماتوگرافی گازی، روشی بسیار عالی برای ارزیابی ترکیبات تشکیل دهنده اسانس های روغنی است. خروجی ستون کروماتوگرافی، از یک سمت به آشکارساز و از سمت دیگر برای ارزیابی توسط انسان هدایت می شود. به این ترتیب رایحه واقعی اسانس قابل تشخیص و ثبت است (Burits and Bucar 2000).

۲-۶-۱- روشهای کروماتوگرافی

کروماتوگرافی نام عام روشهایی است که بوسیله آنها دو یا چند ترکیب در یک مخلوط به طور فیزیکی و بوسیله توزیع متفاوت بین دو فاز از یکدیگر جدا می شوند. این دو فاز عبارتند از یک فاز ساکن که می تواند جامد یا مایع باشد و یک فاز متحرک که گاز یا مایع است و به طور مداوم در فاز ساکن جریان دارد. تفکیک اجزاء مخلوط اساساً نتیجه تمایل متفاوت آنها نسبت به فاز ساکن است در کروماتوگرافی مایع (LC) فاز متحرک یک مایع است در حالی که در کروماتوگرافی گاز (GC) فاز متحرک یک گاز می باشد (Peterson and Cummings 2006).

کروماتوگرافی گاز - جامد (GSC) نوعی کروماتوگرافی است که در آن فاز ساکن جامد می باشد. در کروماتوگرافی گاز مایع (GLS)، فاز ساکن مایعی است که بر روی یک تکیه گاه جامد پخش شده است (Bressolle, Bromet-Petit et al. 1996).

کروماتوگرافی اولین بار در سال ۱۹۰۶ بوسیله یک گیاه شناس روسی به نام میشل توت کشف و نامگذاری شد. او سعی داشت رنگدانه های برگهای رنگین را بوسیله عبور دادن محلول عصاره آنها از یک ستون پر شده از ذرات گچ جذب کننده از یکدیگر جدا کند. هر رنگدانه با سرعت متفاوتی به طرف پایین ستون حرکت کرده از یکدیگر جدا شدند. اجزاء جدا شده در طول ستون به صورت نوارهای رنگی به آسانی قابل تشخیص بودند. از این رو این روش، کروماتوگرافی به معنای کروما (رنگ) + گرافی (نوشتن) نامگذاری شد (Zargari 1994).

۲-۶-۱-۱- کروماتوگرافی مایع - مایع (LLC)

این روش در سال ۱۹۴۱ توسط مارتین و سینتر ابداع شد. آنها به جای یک ماده جاذب جامد، به عنوان فاز ساکن از مایعی استفاده کردند که روی سطح ماده جامدی پخش شده بود و با فاز مایع متحرک غیرقابل اختلاط بود. اجزاء و ترکیبهای موجود در مخلوط بسته به میزان حلالیت بین این دو فاز پخش می شوند. به خاطر ابداع این روش مارتین و سینتر در سال ۱۹۵۲ جایزه نوبل شیمی را دریافت کردند (Marston 2007).

۲-۶-۱-۲- کروماتوگرافی کاغذی (PC)

در این روش تفکیک بر روی ورقه های کاغذ صافی صورت می گیرد. پی بردن به مزایای کروماتوگرافی مسطح سبب پیدایش کروماتوگرافی لایه نازک TLC شد. در این روش تفکیک بر روی لایه های نازکی از ماده جاذب پخش شده بر روی صفحات شیشه ای یا صفحات سخت دیگر انجام می شود. روش TLC از زمانی که استال در سال ۱۹۵۸ در این زمینه کارهای زیادی انجام داد متداول شد. برای بالا بردن قدرت تفکیک ترکیبهای یونی بوسیله TLC یا PC می توان میدانی الکتریکی در طول کاغذ یا صفحه ایجاد کرد . در این صورت روشهای حاصل به ترتیب الکتروفوز کاغذی و الکتروفوز لایه نازک نامیده می شود (Ranjbar, Noori et al. 2010).

۲-۶-۱-۳- کروماتوگرافی گازی (GC)

این روش که اخیراً در بین سایر روشها بیشترین پیشرفت را کرده است ابتدا بوسیله مارتین و جیمز در سال ۱۹۵۲ معرفی شد. امروزه این روش پیچیده ترین و متداولترین روش به ویژه برای مخلوط گازها و مایعات و جامدات فرار (مثل روغنهای اسانسی) می باشد. حتی برای مخلوطهای بسیار پیچیده زمان جداسازی بوسیله GC اکنون در حدود چند دقیقه است. قدرت تفکیک بالا، سرعت عمل تجزیه و حساس بودن روش GC سبب شده است که این روش تقریباً در هر آزمایشگاه شیمی متداول و مرسوم باشد (Cavalli, Tomi et al. 2004).

۲-۷- ترکیبات اسانس گیاهان دارویی

این ترکیبات از دو بخش تشکیل شدن که شامل:

بخش فرار: حدود ۹۵٪ - ۹۰ وزن اسانس را روغن تشکیل می دهد که شامل مونوترپن ها، ترپن هیدروکربن ها و مشتقات اکسیژن دار از قبیل آلدهید های آلیفاتیک، الکل ها و استرها می باشد.

بخش غیر فرار: ۱۰٪ - ۱۰۰ روغن اسانس را تشکیل می دهند و شامل هیدروکربن ها، اسید های چرب، استرول ها، کاروتنوئید ها، واکس ها و استرها می باشد (Zargari 1994).

۲-۷-۱- ترپن ها

عمده ترین ترکیبات اسانس در گیاهان دارویی ترپن ها هستند. این ترکیبات دارای خاصیت ضد التهاب، ضد عفونی کننده و ضد باکتری هستند. واحد ساختاری ترپن ها ترکیباتی دارای ۵ واحد کربن هستند که ایزوپرن نامیده می شود. فرمول مولکولی و ساختمانی ترپن ها $(C_5H_8)_n$ - است و آنها بر اساس تعداد واحد ایزوپرن به ۵ دسته طبقه بندی می شوند:

مونوترپن (دو واحد ایزوپرن)

سزکوئی ترپن (سه واحد ایزوپرن)

دی ترپن (چهار واحد ایزوپرن)

تری ترپن (شش واحد ایزوپرن)

تتراترپن (هشت واحد ایزوپرن) (Zargari 1994).

۲-۷-۱-۱- مونوترپن ها^{۲۱}

مونوترپن نوعی ترپن است که از ۲ واحد ایزوپرن تشکیل شده است و فرمول مولکولی آن $C_{10}H_{16}$ می باشد. مونوترپن الکل به عنوان گرانیول (Geraniol) شناخته می شود. پیشوند گرانیل (-geranyl) نمایانگر ۲ واحد ایزوپرن است. این ترکیبات دارای خاصیت ضد درد، ضد باکتری، ضد خلط و محرک می باشد. این ترکیبات عمده ترین هیدروکربن های غیراشباع در اسانس ها می باشند (Zargari 1994).

۲-۷-۱-۲- سزکوئی ترپن ها^{۲۲}

از ۳ واحد ایزوپرن تشکیل شده است و فرمول مولکولی آن $C_{15}H_{24}$ می باشد. الکل سزکوئی ترپن به عنوان فارنسول (Farnesol) شناخته می شود. پیشوند فارنسیل (-Farnesyl) نمایانگر ۳ واحد ایزوپرن است. این ترکیبات به عنوان ترکیبات ضد استرس در نتیجه استرس یا زخم به وجود می آیند و ساختار آنها ممکن است به صورت خطی، مونوسیکلک یا بی سیکلیک باشد. از جمله خواص درمانی آنها ضد التهاب، آنتی سپتیک، ضد درد، ضد حساسیت می باشد (Zargari 1994).

۲-۷-۱-۳- دی ترپن ها^{۲۳}

با فرمول مولکولی $C_{20}H_{32}$ از ۴ واحد ایزوپرن تشکیل شده است. دی ترپن ها از گرانیل گرانیل پیروفسفات (geranylgeranyl pyrophosphate) مشتق می شوند. ترپن هایی مانند سمبرن (Cembrene) و تاکسادیین (Taxadiene) نمونه های از دی ترپن هستند. همچنین در ترکیبات زیست شناسی مهم مانند رتینول، رتینال و فیتول وجود دارند. این ترکیبات به دلیل وزن مولکولی زیاد به سختی همراه با اسانس در فرآیند تقطیر جدا می شوند و به همین دلیل به ندرت در اسانس دیده می شوند (Zargari 1994).

خواص ضد قارچ، ضد خلط، متعادل کننده هورمونی و کاهش دهنده فشار خون از ویژگیهای درمانی این ترکیبات محسوب می شوند (Zargari 1994).

۲-۷-۱-۴-تری ترین ها^{۲۴}

این ترین دارای ۶ ایزوپرن می باشد. فرمول مولکولی آن $C_{30}H_{48}$ می باشد. اسکوالن (Squalene) که بخش عمده ایزوپرن از روغن کبد کوسه را تشکیل می دهد مثالی از این نوع ترین است (Zargari 1994).

۲-۷-۱-۵-تترا ترین ها^{۲۵}

از ۸ واحد ایزوپرن تشکیل شده است و دارای فرمول مولکولی $C_{40}H_{56}$ می باشد (Zargari 1994). لیکوپن بدون حلقه، ترین تک حلقه ایزوپرن مانند گاما کاروتن (Gamma carotene) و ۲ حلقه ای مانند آلفا و بتا کاروتن نمونه هایی از تترا ترین می باشند (Zargari 1994).

۲-۷-۲-الکل ها^{۲۶}

ترکیباتی هستند که دارای گروه هیدروکسیل می باشند و به صورت طبیعی و یا در ترکیب با استرها وجود دارند. الکل ها از اتصال ترین به یک اتم اکسیژن و یا هیدروژن حاصل می شوند و زمانی که ترین اولیه مونوترین باشد الکل حاصله مونوترینول نامیده می شود. الکل ها به دلیل اینکه واکنش ضعیفی بر روی پوست و یا بدن دارند مشکل حادی بر بدن ایجاد نمی کنند. از ویژگیهای آنها می توان به آنتی سپتیک، ضد ویروس، ضد باکتری و میکروب کش بودن آنها اشاره کرد (Zargari 1994).

۲-۷-۳- اسیدها^{۲۷}

این اجزاء از جمله ترکیباتی هستند که در مقادیر بسیار کم در اسانس یافت می شوند. اسیدهای گیاهی به عنوان سیستم بافر برای کنترل اسیدیته عمل می کنند. از خواص این ترکیبات ضد التهاب بودن آنهاست (Zargari 1994).

۲-۷-۴- کتونها^{۲۸}

کتون یک گروه عاملی است که با یک گروه کربونیل که با دو اتم کربن دیگر پیوند دارد؛ شناخته می شود (Zargari 1994).

۲-۷-۵- آلدئیدها^{۲۹}

آلدئید ترکیبی آلی است که یک گروه کربونیل در یک سر خود دارد. این گروه عاملی دارای کربنی است که از یک سو با پیوند دوگانه به اکسیژن و از سوی دیگر یک اتم هیدروژن پیوند دارد آلدئیدها به خصوص آلدئیدهای چرب بوی خوشایندی دارند و برای ساخت عطر، صمغ های مصنوعی، رنگدانه ها، طعم دهنده های غذایی و سایر ترکیبات شیمیایی استفاده می شوند. از آلدئیدهای معروف می توان اتانال، متانال و بنزآلدئید را نام برد (Zargari 1994).

از خواص این ترکیبات می توان به ضد قارچ (درمان عفونت های قارچی چون کاندیدا)، ضد التهاب، آنتی سپتیک بودن آنها اشاره کرد (Zargari 1994).

27. Acids
28. Ketones
29. Aldehydes

۲-۷-۶- استرها^{۳۰}

ترکیبهای اسیدهای کربوکسیلی به فرمول $R-COOR$ ، استر نامیده می‌شود که در آن گروه R - یک گروه آلکیل یا آریل می‌باشد و یک گروه عمده از ترکیبات آلی را تشکیل می‌دهند. استرها غالباً فرار و معطرند و برخی از آنها در میوه‌های رسیده یافت می‌شوند. مثلاً استات ایزوپنتیل، بوی موز است، والرات ایزوپنتیل بوی سیب بوده و پروپیونات ایزوبوتیل، بوی نیشکر است. خیلی از استرها مانند استات اتیل و استات بوتیل، بعنوان واکنش‌گر و یا حلال و نرم کننده رزینها در آزمایشگاهها و صنعت مورد استفاده قرار می‌گیرند. از لحاظ پزشکی استرها به عنوان ضد قارچ و آرام بخش شناخته شده اند و متعادل کننده سیستم عصبی نیز می باشند. از واکنش الکل با اسید تشکیل می شوند (Zargari 1994).

۲-۷-۷- هیدروکربن ها^{۳۱}

عمده ترین هیدروکربن های موجود در ساختمان گیاهان ایزوپرن هستند. اساس تشکیل هیدروکربن ها اتم های هیدروژن و کربن می باشند (Zargari 1994).

۲-۷-۸- لاکتون ها^{۳۲}

استرها حلقه‌ای که لاکتون نامیده می‌شوند، جزو گروه استرها می‌باشند. مهمترین نقش لاکتون ها خواص ضد التهابی و ضد خلط آوری آنهاست. که احتمالاً به وسیله نقش شان در کاهش تولید پروستاگلاندین نقش خود را ایفا می کنند. لاکتون ها از لحاظ خواص ضد خلط خود حتی از کتون ها هم قویتر می باشند. این ترکیبات همچنین تب بر و ضد آماس نیز می باشند (Zargari 1994).

30. Esters
31. Hydrocarbon
32. Lactones

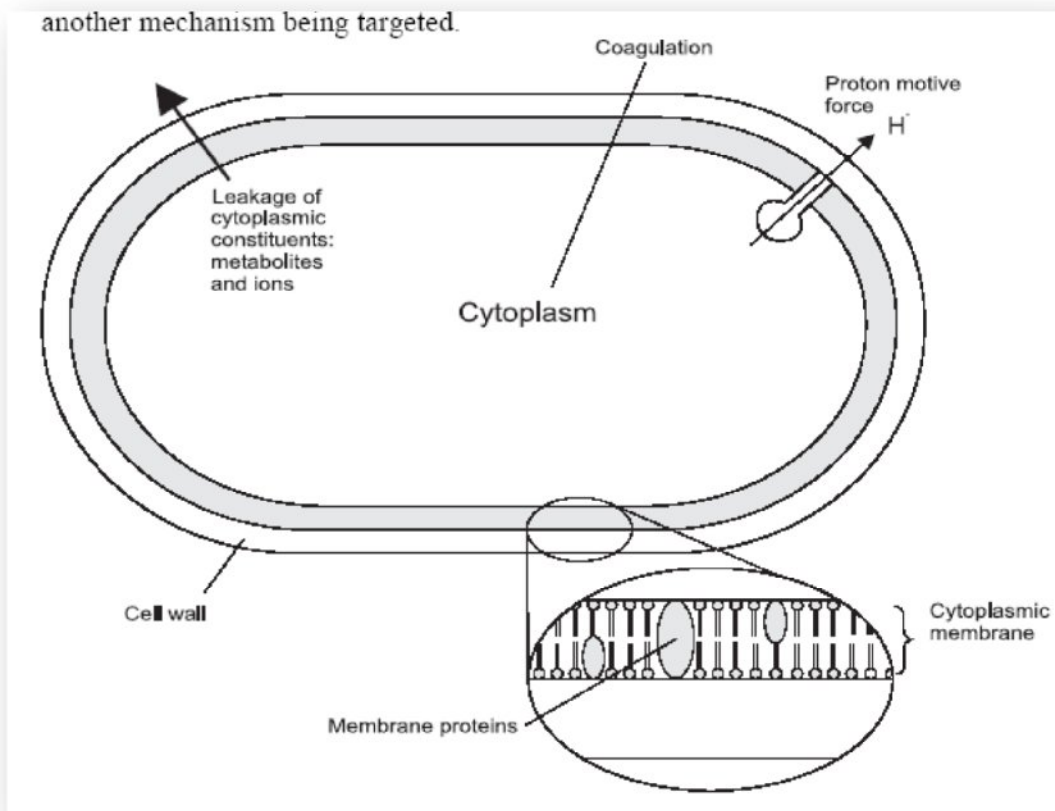
۲-۸- مکانیسم ضد میکروبی اسانس ها

اگر چه مطالعات زیادی روی خصوصیات ضدباکتریایی اسانس ها و ترکیباتشان انجام شده است، اما جزئیات مکانیسم عمل آنها بطور کامل مورد بررسی قرار نگرفته است. ساختمان شیمیایی هر یک از ترکیبات اسانس ها بر طرز عمل و فعالیت ضدباکتریایی آنها تأثیر می‌گذارد. از زمانیکه مشخص شد ترپن های موجود در اسانس‌های ادویه‌جات عوامل ضد میکروبی اولیه هستند، مکانیسم عملی مشابه به این ترکیبات، به آنها نسبت داده شد (Burt 2004) (Naidu 2000). بسیاری از ترپن های بسیار فعال مانند اوژنول، تیمول و کارواکرول بطور طبیعی ساختمان فنلی دارند، بنابراین معقول به نظر می‌رسد که نحوه فعالیت آنها مرتبط با ساختمان فنلی شان باشد (Naidu 2000) (Lambert, Skandamis et al. 2001) (Holley and Patel 2005).

اهمیت حضور گروه‌های هیدروکسیل در ترکیبات فنلی از قبیل کارواکرول و تیمول به اثبات رسیده است (Naidu 2000). بطور کلی میزان بازدارندگی اسانس ها را می‌توان به حضور یک حلقه آروماتیک متصل به یک گروه قطبی نسبت داد. برای مثال بورنتول و توژن در مقایسه با تیمول اثر بازدارندگی کمتری دارند که ناشی از فقدان حلقه آروماتیک در این مواد است. تیمول فعالیت بازدارندگی بیشتری دارد که ناشی از حضور گروه هیدروکسی فنولیک می‌باشد. وجود گروه هیدروکسی فعال باعث شده است که این ماده بتواند به آسانی با جایگاه های فعال آنزیم‌ها، باند های هیدروژنی تشکیل دهد (Farag, Ali et al. 1990). به طور کلی روش عمل اسانس های روغنی به غلظت آنها وابسته است. غلظت های پایین از عمل آنزیم های مربوط به تولید انرژی ممانعت می‌کند در حالیکه مقادیر بالای اسانس موجب رسوب پروتئین ها می‌گردد. با این وجود این مطلب نامشخص است که آیا تخریب دیواره سلولی مربوط به مقدار ترکیبات ضد میکروبی است که سلول در معرض آنها قرار می‌گیرد و یا تأثیر اسانس ها در ابتدا موجب یک تخریب کوچک می‌گردد و سپس تخریب دیواره سلولی ایجاد می‌شود. با توجه به وجود تعداد زیادی از گروه های ترکیبات شیمیایی در اسانس ها به نظر می‌رسد که فعالیت ضد باکتریایی آنها به یک مکانیسم معین محدود نمی‌شود بلکه چندین هدف عمده در سلول وجود دارد (Nychas, Skandamis et al. 2003).

یکی از خواص مهم اسانس ها و ترکیبات آنها خاصیت آبرگریزی آنها می باشد که آنها را قادر می سازد دیواره سلولی باکتری ها یا دیواره میتوکندری ها را تجزیه کنند و باعث تخریب سلولی و نفوذپذیری بیشتر سلول ها شود. نشت یون ها و دیگر محتویات سلولی نیز می تواند اتفاق بیفتد و کم شدن زیاد محتویات سلول باکتری و یا خروج مواد حساس و یونها منجر به مرگ باکتری خواهد شد (Burt 2004). معمولاً اسانس هایی که قویترین خاصیت ضدباکتریایی را در برابر میکروارگانیسم های بیماریزای عامل مسمومیت غذایی دارند، شامل درصد زیادی از ترکیبات فنلی از قبیل کارواکرول، اوژنول و تیمول هستند. به نظر می رسد که مکانیسم عمل آنها مشابه دیگر ترکیبات فنلی باشد. این ترکیبات معمولاً موجب اختلال در غشاء سیتوپلاسمی، شکستن و از هم گسیختن نیروی حرکتی پروتون، جریان الکترونی و انتقال فعال شده و موجب انعقاد و کواگوله شدن محتویات سلولی می شود (Burt 2004) (Farag, Ali et al. 1990). اجزاء اسانس ها همچنین روی پروتئین های موجود در غشاء سیتوپلاسمی اثر می گذارند. آنزیم ها از قبیل ATPase در غشای سیتوپلاسمی جای گرفته اند و بوسیله مولکول های چربی در مرز غشاء وارد شده اند. دو مکانیسم ممکن پیشنهاد شده است که به وسیله آن هیدروکربن های حلقوی می توانند عمل کنند. مولکول های هیدروکربن چربی دوست می توانند در یک لایه بدون چربی تجمع پیدا کنند و واکنش چربی - پروتئین را از شکل طبیعی خارج کنند سپس واکنش مستقیم ترکیبات چربی دوست با قسمت های آبریز پروتئین ها ممکن می گردد (Burt 2004).

شکل ۲-۱- موقعیت و مکانیسم عمل اسانس ها بر سلول باکتری را نشان می دهد (Silva and Fernandes 2010).



شکل ۲-۱- موقعیت و مکانیسم های اثر اسانس ها در سلول باکتری

۲-۹- سنجهش فعالیت ضد میکروبی اسانس ها در محیط آزمایشگاهی

برای سنجهش قدرت ضدباکتریایی اسانس ها روش های متعدد آزمایشگاهی طراحی شده است که می توان به روش های انتشار، ترقیق و بیواتوگرافی اشاره کرد (Burt 2004).

فاکتور های مختلفی مانند روش استخراج اسانس از گیاه، حجم تلقیح، فاز رشدی، محیط مورد استفاده برای رشد، pH محیط، مدت زمان و دمای انکوباسیون نتایج آزمایشات را تحت تاثیر قرار می دهد، بنابراین مقایسه اطلاعات منتشر شده در این زمینه مشکل و پیچیده می باشد (Burt 2004).

۲-۹-۱- معیار تعیین فعالیت ضد میکروبی اسانس ها

حداقل غلظت ممانعت کننده^{۳۳} (MIC) به عنوان معیاری برای تعیین فعالیت ضد میکروبی اسانس ها بیان شده است. همچنین تعیین MIC در مقالات منتشر شده متفاوت است و این مسئله از موانع دیگر مقایسه مطالعات می باشد. در بعضی موارد حداقل غلظت باکتری کشی^{۳۴} (MBC) یا حداقل غلظت ممانعت از رشد باکتری نیز مطرح می گردد (Burt 2004).

MIC حداقل غلظتی است که موجب بازداشتن و یا کاهش دادن قابلیت زنده ماندن میکروب های تلقیح شده می گردد و یا حداقل غلظت مورد نیاز برای مهار کامل ارگانیسم مورد آزمایش تا ۴۸ ساعت پس از تلقیح می باشد و یا حداقل غلظت مورد نیاز که موجب کاهش قابل ملاحظه (تا ۹۰٪) در توانایی زنده ماندن دوز تلقیح می گردد (Burt 2004).

33. Minimum Inhibitory Concentration

34. Minimum Bactericidal Concentration

۲-۹-۲- روش های سنجش فعالیت ضد میکروبی اسانس ها

۲-۹-۲-۱- روش دیسک دیفیوژن

اغلب برای اندازه گیری فعالیت آنتی باکتریال اسانس ها انجام می گیرد یک دیسک کاغذی در اسانس خیسانده می شود و روی پلیت آگاری که با باکتری تلقیح شده است قرار داده می شود. این روش عموماً برای یک بررسی مقدماتی جهت اندازه گیری فعالیت آنتی باکتریال قبل از انجام مطالعات دقیقتر صورت می گیرد (Burt 2004).

۲-۹-۲-۲- روش Agar Well

در این روش اسانس در داخل حفره ای روی آگار قرار داده می شود که این روش را می توان به عنوان یک تست غربالگر در هنگام تراکم تعداد اسانس ها و یا تراکم تعداد باکتری های جدا شده مورد استفاده قرار داد (Burt 2004).

برای تشخیص قدرت فعالیت ضد باکتریایی می توان اسانس ها را در آگار یا براث رقیق کرد و قدرت فعالیت آنها را تعیین نمود. در بررسی های منتشر شده از روش رقیق سازی در آگار، حلال های متفاوتی برای حل کردن اسانس ها در محیط کشت استفاده شده است که بعضی مواقع بصورت خطی و گاهی به شکل نقطه ای بوده است. با وجود این تفاوت ها، MIC مربوط به اسانس های تعیین شده به روش رقیق سازی در آگار تقریباً مشابه بوده است (Burt 2004).

۲-۹-۲-۳- روش رقیق سازی در محیط آبگوشت^{۳۵}

مهمترین آنها شامل:

۱. OD^{۳۶} یا همان اندازه گیری کدورت

35. Broth dillution

۲. شمارش کلنی ها به وسیله روش شمارش باکتری های قابل مشاهده^{۳۷}: این روش دارای مزیت و قابلیت اتوماتیک کردن است و برای روش دوم فعالیت آزمایشگاهی بیشتری لازم است (Burt 2004).

۲-۹-۲-۴- میکرودايلوشن^{۳۸}

روشی جدید برای اندازه گیری MIC اسانس ها با استفاده از اندیکاتور اکسیداسیون - احیاء رزازورین صورت می گیرد (Burt 2004).

یکی از مسائل مهم در آزمایش ها، استفاده یا عدم استفاده از یک امولسیفایر یا حلال برای حل کردن اسانس و یا تثبیت آن در محیط کشت آبی می باشد. مواد مختلفی برای این منظور استفاده می شود که شامل: اتانول، Tween-20، Tween-80، استون در ترکیب با Tween-80، پلی اتیلن گلیکول، دی متیل سولفوکساید^{۳۹} هستند که در اغلب موارد جهت ثبات اسانس ها در محلول از آگار نیز می توان بهره برد (Mann and Markham 1998) (Burt 2004).

۲-۱۰- سنجش اثرات ضد باکتریایی اسانس ها در سیستم های غذایی

با آنکه اثر ضد باکتریایی اسانس ها در سیستم های آزمایشگاهی به خوبی مشخص شده است ولی به هر حال به مقادیر بیشتری از اسانس ها برای ایجاد اثرات مشابه در سیستم های غذایی نیاز می شود. بعنوان مثال در شیر های کم چرب غلظت دو برابر، برای سوسیس جگر غلظت ۱۰ برابر، برای سوپ غلظت ۵۰ برابر و برای پنیرهای نرم غلظت ۱۰۰-۲۵ برابر اسانس برای ایجاد اثرات مشابه نیاز می باشد. این امر به علت وجود واکنش های متقابل مابین ترکیبات فنلی و ماتریکس ماده غذایی واقع می شود (Bagamboula, Uyttendaele et al. 2004) (Burt 2004).

36. Optical density

37. Viable count

38. Microdilution

39. Dimethylsulfoxid

در مواد غذایی نه تنها عوامل داخلی مانند آب، چربی، پروتئین، نگهدارنده ها، آنتی اکسیدان ها، pH، نمک و دیگر افزودنی ها بلکه عوامل خارجی مانند نوع بسته بندی، درجه حرارت و خصوصیات میکروارگانیسم نیز بر روی حساسیت باکتری ها تأثیرگذار می باشند (Burt 2004).

بطور کلی حساسیت باکتری ها به اثر ضد باکتریایی اسانس ها با کاهش pH، کاهش اکسیژن و کاهش درجه حرارت افزایش می یابد. در pH پایین خاصیت هیدروفوبیستی اسانس ها بیشتر شده و اسانس را قادر می سازد به راحتی در لایه لیپیدی غشاء سلول باکتری حل گردد. همچنین بالا بودن میزان چربی و پروتئین در مواد غذایی، باکتری ها را از تأثیر اسانس محافظت می کند. چرا که وقتی اسانس در فاز چربی ماده غذایی حل می گردد جهت اثر بر باکتری های موجود در فاز آبی غذا کمتر در دسترس می باشد. از طرف دیگر مقادیر کمتر آب در غذا در مقایسه با محیط های آزمایشگاهی می تواند مانع پیشرفت عوامل ضد باکتریایی به طرف ناحیه هدف در سلول باکتری گردد. البته در مورد کربوهیدرات ها اثرات محافظتی برای باکتری ها مانند چربی ها و پروتئین ها دیده نشده است (Burt 2004) (Bagamboula, Uyttendaele et al. 2004).

۲-۱۱- استافیلوکوکوس اورئوس^{۴۰}

۲-۱۱-۱- جنس استافیلوکوکوس اورئوس

این جنس متعلق به خانواده میکروکوکاسه^{۴۱} می باشد. تاکنون ۲۷ گونه و ۷ زیر گونه از جنس استافیلوکوکوس شناسایی شده است؛ مسمومیت غذایی استافیلوکوکی به وسیله یک انتروتوکسین^{۴۲} ایجاد می شود. در بین گونه های استافیلوکوکی، استافیلوکوکوس اورئوس از اهمیت خاصی برخوردار بوده که تولید انتروتوکسین اساساً متعلق به این

40. Staphylococcus aureus

41. Micrococuse

42. Entrotoxin

گونه است، هر چند که تولید آن نیز توسط گونه های دیگر مانند استافیلوکوکوس اینتر مدیوس^{۴۳} و استافیلوکوکوس هایکوس^{۴۴} گزارش گردیده است (Frazier and Westhoff 1958).

۲-۱۱-۲- مورفولوژی و ویژگی ها

این باکتری متعلق به خانواده میکرو کوکاسه، جنس استافیلوکوکوس، گونه اورئوس می باشد. اغلب سوش های استافیلوکوک اورئوس کلونی هایی به رنگ زرد طلایی دارند که مربوط به پیگمان های کاروتنوئید است. گاهی اوقات به این باکتری، استافیلوکوک طلایی نیز می گویند. استافیلوکوکوس ها کوکسی شکل، گرم مثبت، غیر متحرک، اختیاری بی هوازی، کاتالاز مثبت، اکسیداز منفی هستند. سلولهای استافیلوکوکوس اورئوس به شکل کروی تا بیضوی با قطر $1 \mu m$ می باشد که به صورت نامنظم شبیه به خوشه انگور (Staphyl) در کنار یکدیگر ارایش می یابند. ویژگی اصلی استافیلوکوکوس اورئوس دارا بودن کواگولاز و ترمونوکلئاز (TNase) است (Jay 2012).

این باکتری به طور گسترده در طبیعت یافت شده و بخشی از فلور طبیعی پوست، بینی گلو و دستگاه گوارش بسیاری از حیوانات و انسان است (Frazier and Westhoff 1958).

بهترین دما برای رشد این باکتری مزوفیل دامنه حرارتی ۷ تا ۴۸ درجه سانتیگراد و اپتیمم حرارت رشد آن تحت شرایط مناسب محیطی ۳۷ درجه سانتیگراد است. ۳ دامنه حرارتی تولید انتروتوکسین محدود بوده و اپتیمم دمای آن ۳۵-۴۰ درجه سانتیگراد است (Adams and Nicolaides 1997).

استافیلوکوکوس اورئوس دارای مقاومت حرارتی غیر متعارفی است بطوریکه فاز سکون مقادیر D^{45} آن ۳ برابر فاز لگاریتمی افزایش می یابد. اسپورهای این باکتری می توانند درجه حرارت جوش و بخار را تحمل کنند ولی سلول های رویشی در مقابل حرارت ناپایدارند (Rezoiler 2001); مقاومت حرارتی اسپور های این باکتری در مقابل حرارت بعنوان شاخص برای سایر مزوفیل ها به حساب می آید. این باکتری در محدوده pH برابر با ۴ تا ۹/۸-۱۰

43. Staph. intermediaries

44. Staph. hyicus

45. Deamal Reduction Time

رشد می‌کند و رشد اپتیمم آن در مقادیر pH ۶-۷ است. دامنه pH تولید آنتروتوکسین محدود است بطوریکه تولید توکسین در pH کمتر از ۶ صورت نمی‌گیرد (Le Loir, Baron et al. 2003).

جنس استافیلوکوک در محیط‌هایی با غلظت بالای نمک حاوی ۵-۷٪ و همچنین a_w پایین رشد می‌کند. گونه استافیلوکوکوس اورئوس توانایی تخمیر قند مانیتول را نیز دارد که موجب تغییر رنگ محیط از قرمز به زرد می‌شود (Adams and Nicolaides 1997).

۲-۱۱-۳- خصوصیات بیوشیمیایی استافیلوکوکوس اورئوس

استافیلوکوک اورئوس کواگولاز مثبت، قند مانیتول را هیدرولیز می‌کند. ^۱Dnase (یک آنزیم مقاوم به حرارت است است که به طور انحصاری در استافیلوکوک اورئوس وجود دارد) مثبت می‌باشد (Le Loir, Baron et al. 2003).

تست کاتالاز در جنس استافیلوکوک، مثبت است. باکتری‌هایی که در شرایط هوازی رشد می‌کنند این آنزیم را تولید می‌کنند. گونه استافیلوکوک توانایی منعقد کردن پلاسماي خروگوش یا انسان را دارد. این ویژگی مربوط به داشتن آنزیم کواگولاز است که موجب لخته شدن پلاسماي سیتراته می‌شود (Adams and Nicolaides 1997).

۲-۱۱-۴- سموم و آنزیم‌ها

استافیلوکوکوس اورئوس آنزیم‌ها و توکسین‌های متعددی تولید می‌کند که باعث بقای باکتری، تجزیه پروتئین‌ها، کربوهیدرات‌ها و چربی‌ها جهت تأمین مواد مورد نیاز، مقاومت در برابر دارو‌ها و قدرت بیماری‌زایی باکتری می‌گردند. کواگولاز، همولیزین، لکوسیدین، پنی سیلیناز، لیپاز، هیالورونیداز، کاتالاز و پروتئاز از جمله این آنزیم‌ها می‌باشند. آنتروتوکسین‌های این میکروب توسط سلول‌های باکتری به غذا یا محیط کشت انتشار پیدا می‌کنند.

استافیلوکوک های انتروتوکسین زا همیشه قادر به تولید کواگولاز می باشند، ولی همه استافیلوکوک های کواگولاز مثبت همیشه انتروتوکسین زا نمی باشند (Adams and Nicolaides 1997).

مسمومیت حاصل از استافیلوکوکوس اورئوس یکی از شایع ترین مسمومیت های غذایی بوده و در اغلب کشورها از نظر وقوع در لیست سه مسمومیت درجه اول قرار دارد (Mendoza, Viteri et al. 1998).

از آنجایی که بیماری های ناشی از این جرم قابل گزارش نیستند، اطلاعات دقیقی از میزان شیوع و بروز بیماری در دنیا در دسترس نیست و اغلب موارد گزارش شده بیماری مربوط به مواقع شیوع بیماری می باشند. در ایالات متحده و انگلستان بین سالهای ۱۹۸۳ تا ۱۹۸۷، به ترتیب استافیلوکوکوس % ۷/۸ از ۶۰۰ مورد و % ۱/۹ از ۲۸۱۵ مورد شیوع مسمومیت های غذایی باکتریایی ثبت شده است (Winn and Koneman 2006).

۲-۱۱-۵- انتروتوکسین های عامل اسهال و استفراغ استافیلوکوکی

مسمومیت غذایی استافیلوکوکی ' اولین بار توسط Denys در سال ۱۸۹۴ میلادی مورد مطالعه قرار گرفت و پس از آن در سال با مصرف شیر آلوده به یک کشت استافیلوکوکوس اورئوس، علائم و نشانه های بیماری را در خود ایجاد نمود. بالاخره Dack و همکارانش در سال ۱۹۳۰ به طور قطعی ثابت نمودند که برخی از سوش های استافیلوکوکوس اورئوس قادر به ایجاد مسمومیت غذایی در انسان می باشند (Omaye 2004).

انتروتوکسین های عامل بیماریهای استافیلوکوکی شامل انترو توکسین های A (SEA)، B (SEB)، C1 (SEC1)، C2 (SEC2)، E (SEE)، C3 (SEC3)، D (SED) هستند (Gasman 1967).

۲-۱۱-۶- مکانیسم اثر انتروتوکسین های عامل مسمومیت

انتروتوکسین ها اثرات خود را بر روده اعمال کرده و از راه واکنش در مقابل آنتی بادی های اختصاصی شناسایی می شوند. انتروتوکسین ها پروتیین های بازی بوده، به آنزیم های پروتئولیتیک مقاومت نشان داده و در حرارت تا ۱۰۰

درجه سانتیگراد برای مدت تا ۳۰ دقیقه پایدار هستند. برای تولید توکسین در مواد غذایی به باکتری 10^6 CFU/g نیاز است (Misaghi, Moosavy et al 2008).

مقدار (aw) برای این ارگانیسم حدود $0/84$ بوده و در شرایط بی هوازی رشد می کند. با وجود این استافیلوکوکوسی در حضور دیگر ارگانیسم ها به خوبی رشد نمی کند. منابع معمول مواد شوع مسمومیت های غذایی استافیلوکوکی، سوسیس های تخمیر شده، سالادها شیرینی های مخصوص (custardas - یک نوع شیرینی توام با فرنی)، مواد و شیرینی های خامه دار هستند. پنیر و شیر منابع کمتر متداولی هستند. به علت قابلیت رشد استافیلوکوکی در محیط حاوی نمک تا ۱۵ درصد، هر نوع ماده غذایی ممکن است محیط خوبی باشد (Frazier and Westhoff 1958).

عوامل مسبب در مسمومیت غذایی انتروتوکسین های A و D، منابع جذب آب از مجرای روده شده و اسهال ایجاد می کنند. این انتروتوکسین ها برگیرنده مرکزی استفراغ هم اثر کرده موجب استفراغ می شود. انتروتوکسین B به اپی تلیوم روده آسیب رسانده و سبب کولیت می شود. بسیاری از سویه های استافیلوکوکوس اورئوس، هیالورونیداز تولید میکنند. این آنزیم اسید هیالورونیک بافت های همبند را هیدرولیز کرده و انتشار اورگانیسم ها به بافت ها را تسهیل می دهند. استافیلوکیناز (فیبرینولیزین) محصول دیگری از چندین سویه استافیلوکوکوس اورئوس بوده که لخته های فیبرین را حل میکند. استافیلوکوکوس اورئوس حاوی لیپاز ها بوده که قادرند غشای سلولی را پاره کنند. همچنین باکتری حاوی لوکوسیدین^۲ بوده که میتواند لوکوسیتها را نابود کند (Frazier and Westhoff 1958).

سه شیوه اثر شامل اثر روده ای یا واکنش استفراغ، اثرات سیستم گردش خون، کاهش فشار خون، کاهش در بازده ادرار، ادم ریوی و احتباس خون در بستر عروقی با نتیجه شوک و مرگ، آثار دیگری چون اثرات آلرژیک به ویژه در کارکنان شاغل در کلینیک ها و تحت مواجهه با نمونه های انسانی شناخته شده است (Frazier and Westhoff 1958).

۲-۱۱-۷- بیماریهای حاصله از استافیلوکوکوس اورئوس

استافیلوکوکوس اورئوس علاوه بر مسمومیت غذائی عامل ایجاد بسیاری از عفونت ها در انسان می باشد:

- ❖ عامل عفونت جراحات پوستی مانند سوختگی ها، گل مژه و آبسه موضعی
- ❖ عامل عفونت عمقی مانند اندوکاردیت، استئومیلت و نیز عفونت های پوستی خطرناک مانند فورونکلوزیس
- ❖ عامل اصلی عفونت های بیمارستانی به ویژه زخم های جراحی و نیز به همراه استافیلوکوکوس
- ❖ اپیدرمیدیس عامل عفونت های ناشی از کاشت وسایل پزشکی در بدن
- ❖ عامل ایجاد سندرم شوک توکسیک به وسیله آزاد سازی سوپر آنتی ژن ها در جریان خون
- ❖ عامل ایجاد بیماری های زرد زخم، کولیت غشا کاذب و مننژیت (Lowy 1998) (Sutherland and Varnam 2002).

۲-۱۱-۸- ارتباط باکتری با مواد غذایی

مهمترین مواد غذایی حساس عبارتند از غذاهای گوشتی (به ویژه کباب کوبیده)، شیر و فرآورده های آن (به ویژه خامه و بستنی)، شیرینی های تر (به خصوص نان های خامه ای)، تخم مرغ و فرآورده های حاوی تخم مرغ مثل انواع کیک ها. به علت مقاومت زیادی که آنترتوکسین ها در مقابل میزان aw دارند می توانند در مواد غذایی خشک از قبیل پودر تخم مرغ و شیرخشک نیز وجود داشته و آنها و سایر مواد غذایی تهیه شده از آنها را آلوده سازند. در طول عمل آوری و دستکاری غذا در صورتی که اصول بهداشتی کارکنان ضعیف باشد آلودگی از پوست، دهان یا بینی کارکنان با سرفه، عطسه، زخم دست یا بازوی آنها انتقال می یابد. گوشت پخته سرد اغلب عامل مسمومیت غذایی استافیلوکوکی است در گوشت قرمز و گوشت طیور در صورت دستکاری زیاد هنگام برش ایجاد می شود اما به علت رقابت با سایر میکروارگانیسم ها قادر به رشد نیست. اما در غذاهای خام مخصوصا تولیدات

حیوانی وجود این باکتری معمول است. آلودگی استافیلوکوکی از پوست و پر حیوان معمول است و می تواند از زخم یا بافت آسیب خورده نتیجه گردد (Omaye 2004) (Frazier and Westhoff 1958).

شستشو و ضدعفونی تجهیزات و وسایل آشپزخانه پس از خاتمه کار، حرارت دادن کافی به غذاها و عدم نگهداری آنها در حرارت های پائین تر از ۶۵ درجه سانتیگراد، جلوگیری از تماس افراد مبتلا به گلودرد و بیماری های ریوی با مواد غذایی، شست و شوی مرتب دست ها و در کانتین ها، کشیدن و سرو غذا با دستکش از جمله موازینی هستند که رعایت آنها در پیش گیری از این مسمومیت غذایی بسیار مؤثر می باشد (Krishnamurthy, Demirci et al. 2008).

مطابق با نتایج تحقیقاتی که در گذشته بر روی اسانس گونه های مختلف خارمشک انجام شده، ترکیبات شیمیایی تشکیل دهنده و درصد ترکیبات موثره اسانس خارمشک در مناطق مختلف دارای اختلاف می باشد که به نظر می رسد که نشان دهنده تاثیر گونه و اختلاف جغرافیایی بر ترکیبات موثره گیاه است.

در مطالعه مقدم و همکاران (۲۰۱۵) آنالیز ترکیبات شیمیایی اسانس اکینوفورا پلاتی لوبا (Echinophora platyloba DC) که در ایران انجام شد نشان داد که عمده ترین ترکیبات موثره آن شامل پارا- سیمن (۲۲/۱۵٪)، آلفا- پنین (۱۸/۵۲٪)، بتا-فلاندرن (۱۴/۴۰٪)، آلفا- فلاندرن (۶/۶۹٪) می باشد (Moghaddam, Taheri et al. 2015).

در بررسی انجام شده توسط سایه دهکردی و همکاران (۲۰۱۲) نشان داد مهمترین ترکیبات شیمیایی اسانس اکینوفورا پلاتی لوبا که توسط GC-MS انجام شد شامل تیمول (۲۷/۱۹٪)، ترانس- اوسیمین (۲۰/۸۹٪) است (Saei-Dehkordi, Fallah et al. 2012).

عمده ترین ترکیبات شیمیایی اسانس اکینوفورا پلاتی لوبا در مطالعه احسانی و همکاران (۲۰۱۳)، اوسیمین (۲۶/۵۱٪)، ۲ و ۳ دی متیل سیکلو هگزادومیننت (۹/۸۷٪)، آلفا- پنین (۷/۶۹٪)، گاما- دودیسنو لاکتون (۵/۶۶٪) (Hashemi, Ehsani et al. 2013).

در بررسی رحیمی و همکاران بر روی اسانس گیاه اکینوفورا پلاتی لوبا جمع آوری شده از اصفهان نشان داد که دلتا-کارن (۱۶/۱۶٪)، بتا-اوسیمین (۲۶/۷۱٪)، لیمونین (۶/۵۹٪) عمده ترکیبات موثره اسانس را تشکیل می دهند (Rahimi, Gholivand et al. 2010).

در مطالعه هاشم پور و همکاران (۲۰۰۹) بر روی اکینوفورا پلاتی لوبا (*Echinophora platyloba* DC) که از شمال ایران (مراغه) تهیه شده بود حاکی از آن است که آلفا فلاندرن (۲۴/۲٪)، بتا-اوسیمین (۳۸/۹٪)، پارا-سیمن (۷/۴٪)، آلفا-پینن (۳/۴٪)، بتا-فلاندرن (۶/۳٪) بیشترین مواد موثره اسانس گیاه مذکور را دارا می باشد (Hassanpouraghdam, Shalamzari et al. 2009).

در مطالعه دیگری که توسط اصغری و همکاران (۲۰۱۰)، گیاه اکینوفورا پلاتی لوبا (*Echinophora platyloba* DC) جمع آوری شده از کوههای الوند ایران با دستگاه کلونجر اسانس گیری و آنالیز GC-MS انجام شده بر روی اسانس نشان داد ترانس-بتا-اوسیمین (۶۷/۹٪)، ۲-فورانون (۶/۲٪)، میرسین (۶٪) عمده ترین ترکیبات اسانس را تشکیل دادند (Asghari, Sajjadi et al. 2010).

در بررسی ترکیبات شیمیایی اکینوفورا اوریتاریس (*Echinophora orientalis*) که از تهران تهیه شده بود، توسط انتظاری و همکاران (۲۰۰۹) انجام شد نشان داد ترانس-بتا-اوسیمین (۶۷/۹٪)، ۲-فورانون (۶٪)، لینالول (۳/۱٪) بیشترین درصد ترکیبات را تشکیل می دهد (Entezari, Hashemi et al. 2009).

در تحقیق دیگری توسط بنی ابراهیم و همکاران (۲۰۱۳) نشان داد آنالیز GC-MS بر روی اسانس گیاه اکینوفورا اوریتاریس (*Echinophora orientalis*) که از اذربایجان شرقی جمع آوری شده بود، بتا-میرسین (۳۲/۱٪)، آلفا-پینن (۱۶/۷٪)، پارا سیمن عمده ترکیبات شناخته شدند (Baniebrahim and Razavi 2013).

آنالیز شیمیایی اکینوفورا اسپینوسا (*Echinophora spinosa*) در بررسی Glamoclija و همکاران (۲۰۱۱) در مونت نگو نشان داد بیشترین ترکیبات اسانس شامل دلتا-کارن (۶۰/۸۶٪)، آلفا-فلاندرن (۷/۱۲٪)، پارا-اوسیمین (۶/۲۲٪)، میرسین (۴/۸۲٪) می باشد (Glamoclija, Sokovic et al. 2011).

Georgiou در مطالعه و همکاران (۲۰۱۰) که در مصر بر روی اسانس گونه گیاه اکینوفورا تینیوفولیا (*Echinophora tenuifolia*) انجام شد، آنالیز GC-MS اسانس حاکی از وجود ترکیبات آلفا فلاندرن (۴۳/۸٪)، متیل اوژنول (۲۸/۶٪)، پارا- سیمین (۹/۵٪)، بتا- فلاندرن (۷/۴٪) بود که بیشترین درصد شامل می شدند (Georgiou, Koutsaviti et al. 2010).

در مطالعه Ali و همکاران (۲۰۱۵) در ترکیه نیز آنالیز GC-MS بر روی اسانس گیاه اکینوفورا لامینودیانا (*Echinophora lamondiana*) انجام شد که عمده ترکیبات آن عبارتند از دلتا کارن (۶/۲۲٪)، آلفا- فلاندرن (۱۲/۸٪) (Ali, Tabanca et al. 2015).

در مطالعه Gokbulut و همکاران (۲۰۱۳) اسانس اکینوفورا تینیوفولیا ترکیبات اصلی اسانس دلتا- کارن (۱۷/۹۳٪)، پارا- سیمین (۸/۹۹٪)، متیل اوژنول (۱۶/۴۱٪)، آلفا- فلاندرن (۹/۳۳٪) شناسایی شد (Gokbulut, Bilenler et al. 2013).

Mileski و همکاران (۲۰۱۴) نیز در مطالعه ای بر روی ترکیبات شیمیایی اسانس اکینوفورا سیتورفیان (*Echinophora sibthorpiana*) نشان داد بیشترین درصد ترکیبات شیمیایی آنالیز شده شامل متیل اوژنول (۶۰/۴۰٪)، پارا- سیمین (۱۱/۱۸٪)، آلفا- فلاندرن (۱۰/۲۳٪) بود. این مطالعه در کشور سبیری انجام شد (Mileski, Dzamic et al. 2014).

اسانس های گیاهی که روغن های فرار (volatile oils) نیز نامیده می شوند، روغن های آروماتیکی مایعی هستند که از گیاهان بدست می آیند تاکنون حدود ۳۰۰۰ اسانس گیاهی شناخته شده است که حدود ۳۰۰ مورد آنها دارای اهمیت تجاری است (Burt 2004). اسانس های گیاهی و ترکیبات آنها دارای فعالیت شناخته شده ضد میکروبی هستند (Basti, Misaghi et al. 2007). اولین بار خاصیت باکتری کشی اسانس به وسیله Delacroix در سال ۱۸۸۱ شناسائی شد (Burt 2004). عوامل طبیعی ضد میکروبی از گیاهان مختلف استخراج می شود که البته فاکتور هایی، این عملکرد ضد میکروبی را تحت تاثیر قرار می دهند (Holley and Patel 2005).

در مطالعه Gokbulut و همکاران اثر ضد باکتریایی و آنتی اکسیدانی اسانس قوی اسانس اکینوفورا تنیوفولیا بر روی تعدادی باکتری های بیماریزای غذایی شامل استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سرئوس و کاندیدا آلبیکنس در محیط کشت را بررسی کردند و نتیجه گرفتند که بیشترین اثر ضد باکتریایی اسانس بر روی باکتری های استافیلوکوکوس و باسیلوس سرئوس بود. حداقل غلظت بازدارنده (MIC) اسانس روی استافیلوکوکوس اورئوس در این مطالعه $1000 \mu\text{g ml}^{-1}$ ذکر شد (Gokbulut, Bilenler et al. 2013).

در مطالعه ای که توسط انتظار و همکاران انجام گرفت نتایج نشان داد که اثر ضد باکتری اسانس گیاه خارمشک بر رشد دو باکتری (استافیلوکوکوس اورئوس و سودوموناس آئروژینوزا اورئوس) حتی در غلظت بالا اسانس، رشد به صفر برسد (Entezari, Hashemi et al. 2009).

در مطالعه حجتی و همکاران نشان داد که اسانس گیاهان خارمشک دارای اثر ضد باکتریایی بوده و بیشترین تاثیر را بر استافیلوکوکوس اورئوس به ترتیب با قطر منطقه بازدارندگی $22/8$ میلی متر و $34/5$ میلی متر داشته است (Zarali, Hojjati et al. 2016).

در بررسی انجام شده توسط هاشمی و همکاران، حساس ترین باکتری نسبت به اسانس لیستریا مونوسیتوژنز و استافیلوکوکوس اورئوس بودند. حداقل غلظت بازدارنده (MIC) اسانس بر روی لیستریا مونوسیتوژنز و استافیلوکوکوس اورئوس $6250 \mu\text{g ml}^{-1}$ و $12500 \mu\text{g ml}^{-1}$ بودند (Hashemi, Ehsani et al. 2013).

در مطالعه میثاقی و همکاران در آزمون باکتریایی نشان داد که حداقل غلظت مهار کنندگی MIC و حداقل غلظت کشندگی MBC باکتریایی اسانس ها پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت مشخص و با گروه آنتی بیوتیک علیه استافیلوکوکوس اورئوس، لیستریا مونوسیتوژنز، سودوموناس ایروژینوزا، اشرشیاکولی و MRSA مقایسه گردید. اثر باکتریایی قوی اسانس خارمشک بر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس مشاهده گردید، بطوری که در $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ MIC=۰/۰۱۶ اثرمهارکنندگی و در رقت $0.63 \mu\text{g ml}^{-1}$ MBC=۰/۰۶۳ اثر کشندگی این باکتری بوده است (Misaghi, Moosavy et al 2008).

در مطالعه احسانی و همکاران نیز نشان دادند که اسانس اکینوفورا پلتی لوبا در برابر باکتری های مورد آزمایش اثر ضد باکتریایی نسبتاً قوی داشت. باکتری های لیستریامونوسایتوژنز و استافیلوکوکوس اورئوس حساس ترین باکتری ها در مقابل اسانس بوده اند. حداقل میزان بازدارندگی اسانس در برابر لیستریا مونوسایتوژنز و استافیلوکوکوس اورئوس به ترتیب 6250 و $1250 \mu\text{g ml}^{-1}$ بود (Hashemi, Ehsani et al. 2013).

در مطالعه سایه دهکردی و همکاران (۲۰۱۲) تاثیر اسانس اکینوفورا پلتی لوبا در مقابل باکتری های گرم مثبت از جمله لیستریا مونوسیتوژنز، استافیلوکوکوس اورئوس، کپک و مخمرها مورد بررسی قرار گرفت. باکتری لیستریا مونوسیتوژنز و ایشیرشیاکلی مقاوم ترین و استافیلو کوکوس اورئوس حساسترین باکتری در مقابل اسانس بودند (Saei-Dehkordi, Fallah et al. 2012).

در مطالعه Michielin و همکاران میکروارگانسیم هایی مانند باسیلوس سوبتلیس، استافیلوکوکوس اورئوس، ایشیرشیاکلی، لیستریا مونوسیتوژنز مورد بررسی قرار گرفت. لازم به ذکر است که MIC برای استافیلوکوکوس اورئوس $448 \mu\text{g ml}^{-1}$ بود (Michielin, Salvador et al. 2009).

در مطالعه شرافتی و همکاران نیز خواص ضد میکروبی اسانس اکینوفورا پلتی لوبا مورد بررسی قرار گرفت. MIC در رنج $31/25$ و $62/5 \mu\text{g ml}^{-1}$ بود (Sharafati-chaleshtori, Rafieian-kopaei et al. 2012).

در مطالعه نسرين فياض و همکاران اثرات ضد میکروبی اکینوفورا پلتی لوبا بر استافیلوکوکوس اورئوس ثابت شد. نتایج نشان داد MIC این گیاه بر روی استافیلوکوکوس اورئوس $0/9 \mu\text{g ml}^{-1}$ است و حتی در غلظت های بالاتر رشد میکروارگانسیم را به صفر رساند (Fayyaz, MohamadiSani et al. 2015).

فصل سوم: روش پژوهش

۳-۱- نوع مطالعه

نوع مطالعه تحقیق انجام شده پایه (نیمه تجربی) می باشد که بر اساس مطالعات آزمایشگاهی، آزمایشات مربوطه در آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی قزوین انجام شد.

۳-۲- مواد و دستگاه و تجهیزات مورد استفاده

۳-۲-۱- مواد مصرفی

- ❖ ارگانیسم های مورد مطالعه: S. aureus ATCC 6538 از سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران.
- ❖ گیاهان مورد مطالعه: گیاه خشک شده خارمشک (Echinophora Orientalis) جمع آوری شده از دامنه های کوه بینالود نیشابور.
- ❖ محیط های کشت مصرفی: Brain Heart (Merck, KGaA) Brain Heart Infusion Agar، Brain Heart (Merck, KGaA, Darmstadt, Germany) Infusion Broth و Peptone Water (Merck,)، Agar Bred Parker (Merck, Germany)، دی متیل سولفوکساید^۱: (Merck, Schuchardt OHG, Hohenbrunn, Germany)، سوپ تجاری الیت

۳-۲-۲- ابزار و دستگاه ها

- ۱- دستگاه کلونجر^۲: به منظور استخراج اسانس های مورد مطالعه.
- ۲- دستگاه گاز کروماتوگرافی متصل به طیف سنج جرمی (GC-MS^۳): برای آنالیز ترکیب شیمیایی اسانس های مورد مطالعه.

1. Dimethylsulfoxide
2. Clevenger

۳- دستگاه ترموشیکر میکروپلیت؛ به منظور مخلوط نمودن و گرمخانه گذاری میکروپلیت ها (PST- 60HL PLUS, BOECO, Germany).

۴- میکروپلیت های استریل ۹۶ چاهکی (Sarsted, inc. USA).

۵- اسپکتروفتومتر (Pharmacia LKB-Nova Spacell England).

۶- دستگاه شیکر ارلن.

۷- آسیاب برقی.

۸- یخچال فریزر.

۹- سمپلر.

۱۰- فلاسک شیشه ای

۳-۳- روش کار

در این مطالعه اثر اسانس خارمشک، روی باکتری های استافیلوکوکوس اورئوس در محیط کشت آزمایشگاهی و در یک مدل غذایی که سوپ جو تجاری می باشد، در مدت نگهداری در دمای یخچال مورد بررسی قرار گرفت. بدین صورت که در مرحله اول آزمایش فعالیت ضد میکروبی اسانس مورد مطالعه بر روی باکتری مورد مطالعه (MIC) در محیط کشت آزمایشگاهی مورد ارزیابی قرار گرفت. در مرحله دوم تأثیر ضد میکروبی غلظت های مختلف اسانس مورد مطالعه (، ۲۵/۵، ۱۲/۵، ۶/۲۵، ۳/۱۲۵، ۱۵۰ $\mu\text{g ml}^{-1}$)، بر روی استافیلوکوکوس اورئوس، در سوپ جو تجاری در دمای

یخچال به مدت ۵ روز از طریق کشت سطحی روی محیط جامد برد پارکراگار بررسی شد. در ادامه پذیرش حسی سوپ جو تجارتي حاوی غلظت های مختلف اسانس های مورد مطالعه ارزیابی گردید.

۳-۳-۱- تهیه گیاه و تایید علمی آن

گیاه خارمشک از دامنه های کوه بینالود نیشابور واقع در استان خراسان رضوی در سال ۱۳۹۴ تهیه و توسط گروه گیاه شناسی دانشکده داروسازی دانشگاه تبریز از نظر صحت نام علمی تایید شد.

۳-۳-۲- روش تهیه اسانس و آنالیز آن

به منظور استخراج اسانس گیاه خارمشک، بخش های خشک شده گیاه کاملاً آسیاب و با استفاده از یک دستگاه کلونجر به مدت ۳ ساعت روغن فرار آن به روش تقطیر توسط آب استخراج گردید. پس از آب گیری توسط سولفات سدیم خشک، تا هنگام تعیین خواص ضد باکتریایی و هم چنین تشخیص و تعیین ترکیب های تشکیل دهنده، اسانس در ظروف شیشه ای تیره و در یخچال نگهداری شد. ابتدا نمونه آماده شده اسانس به دستگاه کروماتوگرافی گازی تزریق شد و مناسب ترین برنامه ریزی دمایی ستون برای جداسازی کامل ترکیب های اسانس بدست آمد. همچنین درصد ترکیب های تشکیل دهنده اسانس و شاخص بازداری هر ترکیب محاسبه شد. سپس اسانس به دستگاه گاز کروماتوگرافی متصل به طیف نگار جرمی نیز تزریق شده و طیف جرمی ترکیب ها بدست آمد (Sparkman 2005, Mileski, Dzamic et al. 2014).

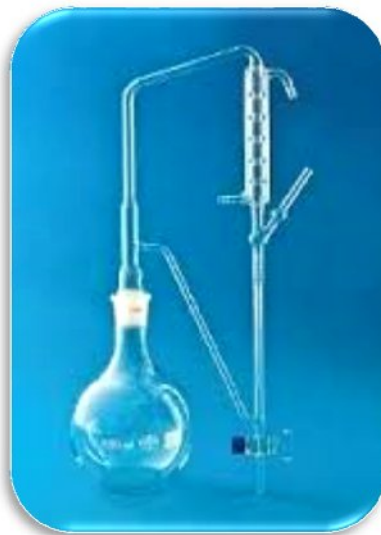
در این مطالعه دستگاه GC-MS از نوع Agilent 6890 با ستون موئینه به طول ۳۰ متر، قطر داخلی ۰/۲۵ میلیمتر و ضخامت لایه داخلی ۰/۲۵ میکرومتر از نوع HP-5MS با برنامه دمایی ستون در ابتدا بصورت ۷۰ درجه سانتیگراد با توقف ۲ دقیقه در این دما سپس افزایش دما تا ۲۲۰ درجه سانتیگراد با سرعت ۱۵ درجه در هر دقیقه، و افزایش دمای ستون تا ۳۰۰ درجه سانتیگراد به مدت ۲ دقیقه استفاده شد.



شکل ۳-۱- گیاه خشک شده (جمع آوری شده از کوه بینالود نیشابور در تابستان ۱۳۹۴)



شکل ۳-۲- آسیاب برقی



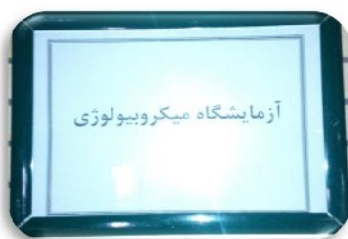
شکل ۳-۳- ست کلونجر



شکل ۳-۴- دستگاه کروماتوگرافی (GC)

۴-۳-۳- باکتری استافیلوکوکوس اورئوس مورد مطالعه

کشت لیوفلیزه استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 6538 مولد انتروتوکسین C تهیه شده از سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران جهت این بررسی مورد استفاده قرار گرفت. در ابتدا این کشت لیوفلیزه در محیط براث BHI در ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۱۸ ساعت، دو مرتبه بطور متوالی تجدید کشت گردید. سپس کشت دوم به میزان پنج به یک با گلیسرین استریل مخلوط شد و در قسمت های مساوی در لوله های میکروسانتریفیوژ اپندورف استریل در ۲۰ - درجه سانتیگراد نگهداری شد.



شکل ۳-۵- تجدید کشت باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در محیط کشت BHI Broth

۳-۳-۴- ارزیابی فعالیت ضد باکتریایی اسانس

ارزیابی MIC^5 و MBC^6 اسانس گیاه خارمشک بروی باکتری پاتوژن مورد مطالعه بر اساس روش توصیف شده گولوس و همکاران انجام شد (Gulluce, Sahin et al. 2007).

ابتدا کشت باکتریایی در محیط آبگوشت قلب و مغز^۷ به مدت ۱۲ ساعت برای باکتری مذکور انجام شد، سپس سوسپانسیون باکتریایی با استاندارد ۰/۵ مک فارلند تنظیم شد. اسانس گیاه مذکور در محلول دی متیل سولفوکساید ۱۰ درصد در بالاترین غلظت مورد استفاده در این تحقیق ($10000 \mu g ml^{-1}$) حل شد، سپس ۸ رقت متوالی از این اسانس به صورت two-fold در محدوده ($10000-78/125 \mu g ml^{-1}$) در لوله های آزمایش استریل حاوی ۱۰ میلی لیتر براث تهیه شد (Hashemi, Ehsani et al. 2013).

میزان MIC اسانس خارمشک علیه باکتری پاتوژن مورد مطالعه بر اساس روش میکرو ول دایلوشن^۸ تعیین شد. در هر چاهک میکروپلیت مقدار $95 \mu l$ نوترینت براث و $5 \mu l$ از کشت باکتری استافیلوکوکوس اورئوس استاندارد شده با ۰/۵ مک فارلند اضافه شد. در ادامه $100 \mu l$ از محلول های استوک آماده شده اسانس با غلظت های مورد مطالعه به ترتیب از بالاترین غلظت در هر چاهک اضافه شد. لازم به ذکر است که در هر سری آزمایش در هر کدام از فازهای یاد شده، کنترل مثبت و کنترل منفی در نظر گرفته شد. در ادامه میکروپلیت به مدت ۲۰ ثانیه با دور rpm ۳۰۰ شیک شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری شد. سپس در پایان زمان انکوباسیون (۲۴ ساعت) مقادیر MIC به عنوان حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد و MBC به عنوان حداقل غلظت کشنده باکتری بر حسب $\mu g ml^{-1}$ محاسبه شد (Gulluce, Sahin et al. 2007).

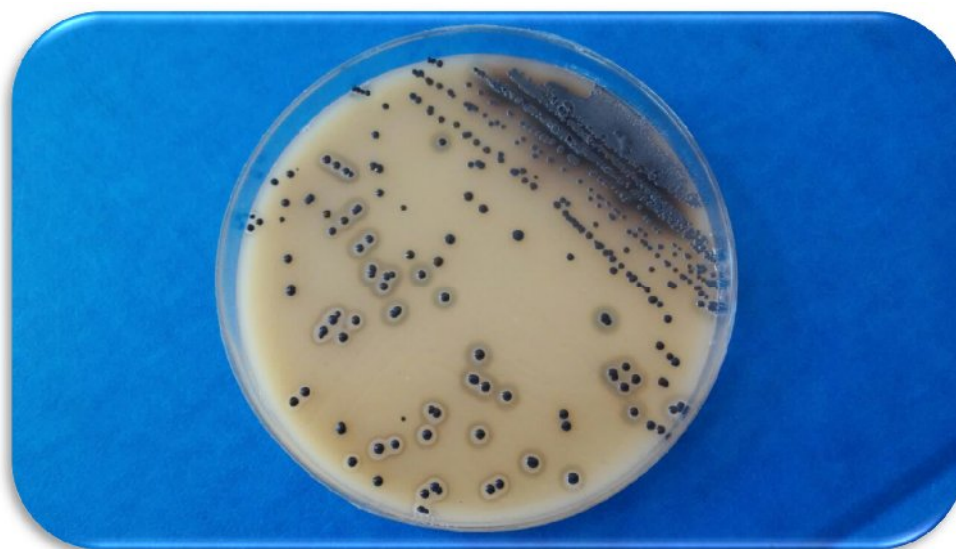
رشد میکروبی از طریق بررسی میزان جذب نوری در طول ۶۰۰ نانومتر ارزیابی شد، جهت تایید، میزان $5 \mu l$ از محتویات چاهک های شفاف روی برد پارکر آگار کشت شد (Hashemi, Ehsani et al. 2013).

-
5. Minimum inhibition concentration
 6. Minimum bactericidal concentration
 7. Brain Heart Infusion Broth (BHI)
 8. Micro-well dilution assay

۳-۳-۵- روش شمارش میکروبی

از محلول آب پیتونه ۰/۱٪ استریل به عنوان محلول رقیق کننده استفاده گردید و لوله های تهیه رقت از 10^{-2} تا 10^{-8} ۱۰ مورد استفاده قرار گرفت. جهت شمارش پرگنه های استافیلوکوکوس اورئوس از روش کشت سطحی در محیط اختصاصی آگار بردپارکر استفاده شد (Speck 1992).

برای این منظور از محتویات هر یک از لوله های تهیه رقت مقدار ۰/۱ میلی لیتر برداشته و در سطح دو پلیت بردپارکر کشت داده شد. سپس پلیت ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری شد. پلیت های استاندارد انتخاب و پرگنه های کروی شکل، نرم، مقعر، مرطوب با قطر ۱/۵-۱ سانتیمتر با رنگ خاکستری سیاه و یا کاملاً سیاه که لبه های صاف و واضح داشته و یا بدون هاله در اطراف پرگنه بودند شمارش شدند. شکل (۳-۶) میانگین پرگنه های شمارش شده در دو پلیت برای رقت مربوطه در نظر گرفته شد و حاصلضرب تعداد باکتری در فاکتور رقت به عنوان تعداد استافیلوکوکوس اورئوس در هر گرم یا میلی لیتر از نمونه گزارش گردید (Bergdoll 1990) (Matejic, Dzamic et al. 2016) (Choobkar, Soltani et al. 2010).



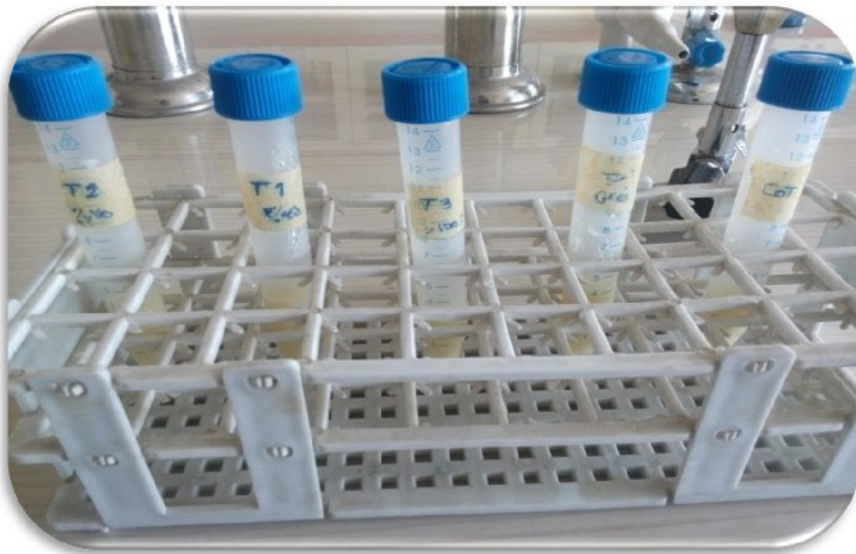
شکل ۳-۶- کلنی های باکتری استافیلوکوکوس اورئوس رشد یافته در محیط کشت اختصاصی برد پارکراگار

۳-۳-۶- تایید پرگنه های استافیلوکوکوس اورئوس

جهت تایید پرگنه های شمارش شده ابتدا جذری از تعداد پرگنه هایی که در پلت استاندارد شمارش شده بودند را انتخاب کرده و هر کدام را با انتقال به محیط برد پارکر آگار به صورت خطی (Streak Method) کشت داده و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری شد. سپس از پرگنه های رشد کرده در برد پارکر آگار گسترش میکروبی تهیه شده و رنگ آمیزی گرم به عمل آمد. پس از مشاهده کوکسی های بنفش رنگ (گرم مثبت) که آرایش خوشه ای داشتند، از محیط آگار خوندار و مانیتول سالت آگار و آزمون های بیوشیمیایی کاتالاز و کوآکولاز برای تفریق استافیلوکوکوس اورئوس از باکتری های مشابه استفاده گردید (Rezoiler 2002).

۳-۳-۵- آماده سازی نمونه غذایی و انجام آزمون میکروبی

در این مطالعه از سوپ جو به عنوان مدل غذایی استفاده شد. جهت انجام آزمون میکروبی در مدل غذایی، ابتدا نمونه های سوپ طبق دستورالعمل پخت قید شده بر روی بسته آماده سازی شد. سپس سوپ آماده شده را در حجم های مناسب به داخل فلاسک ها تزریق نموده و اتوکلاو شد (۱۲۱ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ دقیقه)، پس از اتوکلاو به فلاسک های حاوی نمونه های سوپ آماده شده که تیمارهای این مطالعه (شامل ۵ تیمار) بود، باکتری استافیلوکوکوس اورئوس به میزان $10^3 \mu\text{g ml}^{-1}$ تلقیح شد. اسانس مذکور در غلظت های مختلف (با توجه به یافته های بخش MIC و حسی) اضافه و نمونه های کنترل (محیط فاقد اسانس به عنوان کنترل مثبت و یک محیط فاقد باکتری به عنوان کنترل منفی) نیز در نظر گرفته شد. ارزیابی فعالیت ضد میکروبی اسانس در نمونه های سوپ طی روزهای ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ نگهداری در دمای یخچال مورد ارزیابی قرار گرفت. آزمایش ها سه بار تکرار شد (PajuhiAlamuti, Hosein et al 2012).



شکل ۳-۷- نمایی از تیمارهای مورد مطالعه در مدل غذایی (شامل سوپ+ باکتری+ غلظت های مختلف اسانس)

۳-۳-۶- ارزیابی حسی

اسانس خارمشک ضمن اینکه دارای اثرات ضد میکروبی قوی می باشد، در طعم زائی غذاها نیز می تواند تاثیر گذار باشد لذا با توجه به اینکه به دلیل تند بودن طعم و بوی این اسانس نمی توان مقادیر دلخواه از اسانس را به غذاها اضافه نمود ضروری است تا با تشکیل اعضاء پانل کنترل، حد قابلیت رضایت مندی از طعم، رنگ، بو و شکل ظاهری را پس از افزودن مقادیر مختلف اسانس به غذا مشخص شود. برای ارزیابی ویژگی های حسی ناشی از افزودن اسانس خارمشک به سوپ از آزمون پذیرش حسی^۹ استفاده شد. برای این منظور سوپ آماده شده به هفت قسمت (شامل حجم مناسبی از سوپ) تقسیم، سپس اسانس مورد مطالعه در غلظت های مورد مطالعه به هر فلاسک اضافه شد. ارزیابی حسی بوسیله یک پانل هفت نفره صورت گرفت. اعضای پانل معیار خود از ارزیابی حسی سوپ حاوی اسانس را با استفاده از یک مقیاس حسی ۹ نمره ای^{۱۰} مشخص کردند. در این مقیاس نمره ۹ خیلی عالی، نمره ۸ عالی، نمره ۷ خوب، نمره ۶ نسبتاً خوب، نمره ۵ نه خوب نه بد، نمره ۴ نسبتاً بد، نمره ۳ بد، نمره ۲

9. Sensory acceptance test

10. Nine point hedonic scale

خیلی بد و نهایتاً نمره ۱ فوق العاده بد، برای ارزیابی ویژگی های حسی لحاظ شد (Hashemi, Ehsani et al. 2013).

بدین منظور سوپ حاوی سه غلظت اسانس و یک نمونه شاهد و فاقد اسانس مورد آزمون قرار گرفت. همچنین در مورد سؤال پذیرش کلی، عدد ۱ به معنای پذیرش نمونه و عدد ۰ به معنای عدم پذیرش نمونه در نظر گرفته شد (Jafarzadeh, Aghazadeh et al. 2010).

۳-۷- تجزیه و تحلیل آماری

اثر اسانس مورد مطالعه بر روی شمارش باکتریایی توسط تجزیه واریانس (ANOVA) با استفاده از نرم افزار SPSS 17 انجام شد. کل آزمایشات سه مرتبه تکرار گردید. حداقل اختلاف معنی دار با $P < 0.05$ مورد پذیرش بود.

۳-۸- مکان و زمان مطالعه

آزمایشات مربوط به مطالعه در آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی قزوین در سال ۹۵ - ۹۴ انجام شد.

۳-۹- محدودیت های پژوهش

- تفکیک نکردن اسانس خارمشک جهت تعیین اینکه کدام ماده موثره اثر بازدارندگی بیشتری دارد.
- عدم دسترسی به پنلیست های متخصص جهت ارزیابی حسی در مطالعه.

فصل چهارم: یافته ها

۴-۱- نتایج آنالیز ترکیبات شیمیایی اسانس با استفاده از GC-MS

نتایج آنالیز ترکیبات شیمیایی اسانس خارشک بوسیله دستگاه GC-MS در جدول ۴-۱ نشان داده شده است. میزان بازده استخراج اسانس قابل قبول و 0.57% بر اساس وزن خشک نمونه بود. در مجموع ۴۳ ترکیب شناسایی شد که بیشترین ترکیبات اسانس گاما- دکالاکتون ($21/15\%$)، بتا- سیس اوسیمین ($15/27\%$)، لینالول ($8/82\%$)، اسپاتولنول ($7/74\%$)، اوژنول متیل اتر ($6/61\%$)، آلفا- ترپیننال ($3/68\%$) و آلفا- پینن ($3/19\%$) تشکیل دادند.

۴-۲- نتایج بررسی فعالیت ضد باکتریایی اسانس در محیط کشت

میزان MIC و MBC خارشک بر علیه باکتری مورد مطالعه به ترتیب در غلظت ۷۵ و $125 \mu\text{g ml}^{-1}$ مانع رشد باکتری استافیلوکوکوس اورئوس شدند (جدول ۴-۲).

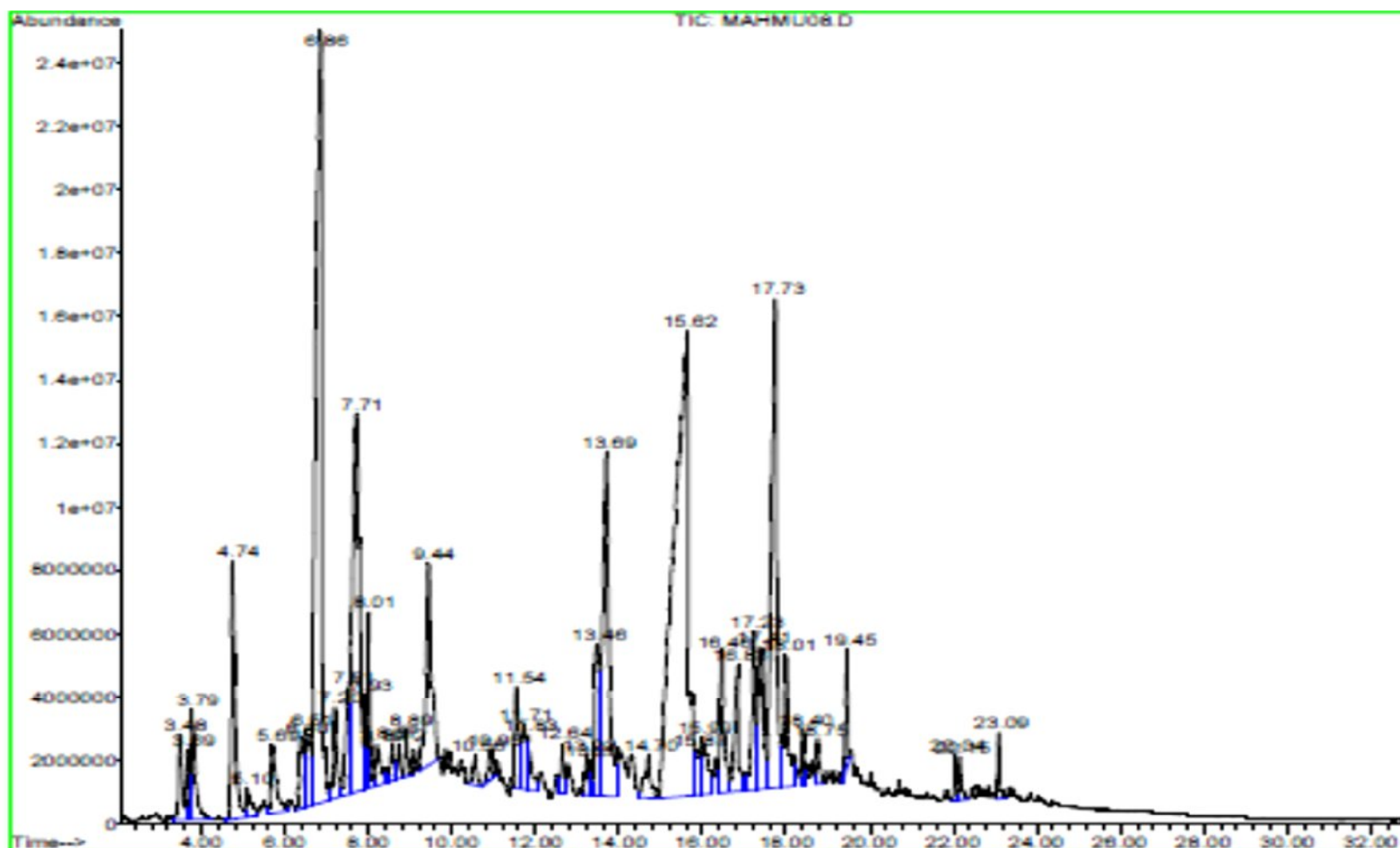
جهت تایید کشت وجود یا عدم وجود باکتری مورد مطالعه، محتویات داخل خانه های میکرو پلیت را با انتقال به محیط آگار BHI به صورت خطی (Streak Method) کشت داده و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری شد (شکل ۴-۱).

۴-۳- نتایج ارزیابی حسی اسانس

میزان میانگین پذیرش خصوصیات حسی سوپ جو تجارتی حاوی غلظت های مختلف اسانس خارشک در جدول ۴-۳ نشان داده شده است. طبقه بندی آنالیز واریانس (ANOVA) نمونه ها بر اساس طرح دانکن ($\alpha=0.05$) انجام شد. در مورد آزمون بو از غلظت ۱۲/۵ بیشتر تغییرات به صورت معنی داری مشاهده شد. در مورد مزه در اولین غلظت که $6/25 \mu\text{g ml}^{-1}$ می باشد تغییرات احساس شده ولی بین غلظت های ۱۲/۵ و $25 \mu\text{g ml}^{-1}$ تغییر قابل ملاحظه ای مشاهده نشده است. در مورد رنگ غلظت $12/5 \mu\text{g ml}^{-1}$ و غلظت صفر یکسان مشاهده شده در صورتی که در گروه های غلظت $6/25$ و $25 \mu\text{g ml}^{-1}$ تغییرات رنگ به صورت معنی داری متفاوت مشاهده شد.

تعیین اثر ضدباکتریایی اسانس گیاه خارمشک...

یافته ها



شکل ۴-۱- منحنی کروماتوگرام آنالیز اسانس روغنی خارمشک

جدول ۴-۱- آنالیز ترکیبات اسانس خارشک با استفاده از GC-MS *

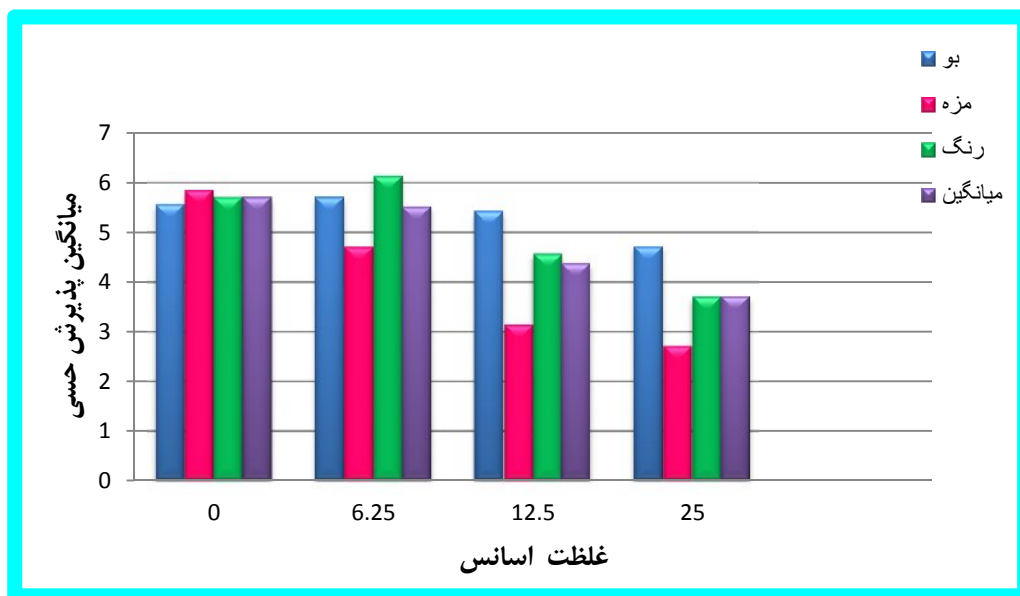
شماره ترکیب	نام ترکیب	زمان بازدارندگی ^۱ (دقیقه)	درصد ترکیب
۱	۳- متیلن سیکلو هپتان	۳/۷۸	۱/۴۶
۲	آلفا- پینن	۴/۷۴	۳/۱۹
۳	بتا- میرسین	۵/۶۹	۱/۱۷
۴	سیس- اوسیمن	۶/۵۰	۱/۳۶
۵	بتا- ترانس اوسیمن	۶/۶۸	۱۵/۲۷
۶	لینالول	۷/۷۱	۸/۸۲
۷	اتانول، ۲- متوکسی فیل	۸/۰۱	۱/۰۹
۸	آلفا- ترپینئول	۹/۴۴	۳/۶۸
۹	بتا- اتانول	۱۱/۵۴	۱/۲۱
۱۰	۳- بنزیل - ۱، ۲، ۴- تریازول	۱۳/۴۶	۲/۳۶
۱۱	بنزن، ۱، ۲- دی متوکسی -۴- (۲- پروپنیل)	۱۳/۶۹	۶/۶۱
۱۲	گاما- دکالاکتون	۱۵/۶۲	۲۱/۱۵
۱۳	پیننل	۱۵/۹۹	۱/۲۸
۱۴	بتا- پینن	۱۶/۴۶	۱/۹۰

۱۵	گاما- دودکالاکتون	۱۶/۸۳	۱/۶۲
۱۶	ایزواروماندترین	۱۷/۲۳	۱/۸۹
۱۷	۳-۱- هگزینول بنزوات	۱۷/۴۱	۲/۴۶
۱۸	بتا- اسپاتونول	۱۷/۷۳	۷/۷۴
۱۹	دی جِرماکرِن	۱۸/۰۱	۱/۵۸
جمع		۹۹/۰۵	

* در این جدول به ترکیبات اساسی از لحاظ دارا بودن بیشترین درصد اشاره شده و از ذکر ترکیبات جزئی پرهیز شده است

جدول ۴-۲- حداقل غلظت ممانعت کنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) اسانس خارشک ($\mu\text{g ml}^{-1}$)

فعالیت ضدباکتریایی	غلظت اسانس خارشک ($\mu\text{g ml}^{-1}$)										
	۲۰۰	۱۷۵	۱۵۰	۱۲۵	۱۰۰	۷۵	۵۰	۲۵	۱۲/۵	۶/۲۵	۳/۱۲۵
MIC	-	-	-	-	-	*	-	-	-	-	-
MBC	-	-	-	*	-	-	-	-	-	-	-



نمودار ۴-۱- میانگین پذیرش حسی سوپ جو حاوی غلظت های مختلف اسانس



شکل ۴-۱- تایید پرگنه های استافیلوکوکوس اورئوس با کشت محتویات داخل خانه های میکرو پلیت بر روی محیط کشت برد پارکر آگار

۴-۴- نتایج بررسی تأثیر ضد باکتریایی اسانس در مدل غذایی

تأثیر بکارگیری غلظت های مختلف اسانس خارشک در سوپ جو تجارتي بر روی میانگین تعداد باکتری های استافیلوکوکوس اورئوس در دمای یخچال در جدول ۳-۴ نشان داده شده است.

در غلظت های ۶/۲۵ و ۰ $\mu\text{g ml}^{-1}$ بین روزها اختلاف معنی دار است و همچنین بین تیمار ۰ و سایر غلظت ها در یک گروه تفاوت معنی دار مشاهده شد ($P < 0.05$).

در غلظتهای ۱۲/۵ و ۲۵ $\mu\text{g ml}^{-1}$ عدم تفاوت معنا دار را نشان داد ($P < 0.05$).

جدول ۳-۴- شمارش باکتری استافیلوکوکوس اورئوس تحت تأثیر غلظت های مختلف اسانس خارشک ($\mu\text{g ml}^{-1}$) در سوپ جو تجارتي در مدت ۵ روز نگهداری در دمای یخچال (۳ درجه سانتی گراد)

غلظت/روزها	۰	۶/۲۵	۱۲/۵ ^{NS}	۲۵ ^{NS}
اول	۲۴۸/۳۳ ^a ±۶/۲۳	۶۲/۳۳ ^d ±۴/۰۷	۰	۰
دوم	۵۴۵ ^b ±۱۲/۲۴	۴۲/۶۶ ^c ±۳/۰۲	۰	۰
سوم	۶۷۶/۶۷ ^c ±۱/۳۱	۱۶ ^b ±۰/۸۱	۰	۰
چهارم	۸۳۰ ^d ±۱/۳۳	۱/۳۳ ^a ±۰/۶۵	۰	۰
پنجم	۱۰۷۴ ^c ±۱/۹۴	۰ ^a	۰	۰

- NS= Not Significant

- میانگین اعداد نشان داده شده در هر ستون با حروف متفاوت از نظر آماری تفاوت معنی داری را نشان می دهد ($P < 0.05$).

فصل پنجم: بحث، نتیجه گیری و

ارائه پیشنهادات

۵-۱- بحث و نتیجه گیری

خطرات و عوارض ناشی از محافظت کننده های شیمیایی و سنتتیک و همچنین افزایش مقاومت آنتی بیوتیکی باکتریهای بیماری زا، توجه به سمت جایگزینی آنها با نگهدارنده های طبیعی و بی خطر بویژه نگهدارنده های طبیعی معطوف شده است. علاوه بر این بر اساس گزارش سازمان بهداشت جهانی، ۸۰٪ از مردمی در کشورهای توسعه یافته، کم و بیش برای درمان از گیاهان دارویی نیز استفاده می نمایند. این امر لزوم تحقیقات جامع تر در حیطه گیاهان دارویی را گوشزد می نماید. افزایش روزافزون مقالات انتشار یافته در زمینه خصوصیات ضد میکروبی گیاهان ضرورت این مسئله را توجیه میکند (Burt 2004, Fahimeh, Ali et al. 2013).

جداسازی و شناخت ترکیبات اسانس ها و بررسی فعالیت ضد میکروبی آنها در مواد غذایی بدون تأثیر نامطلوب در خصوصیات حسی و ارزش تغذیه ای مواد غذایی امری است که در مطالعات امروزی بیشتر مد نظر می باشد، چرا که واکنش اسانس با اجزای غذایی به طبع افزایش غلظت های بالای آنها را می طلبد که این امر امکان تغییرات نامطلوب ارگانولپتیک در ماده غذایی را به همراه دارد (Pajohi, Tajik et al. 2011). بنابراین بکارگیری روشهای هردل بهترین گزینه جهت کاهش دوز نگهدارنده های طبیعی به منظور محافظت مواد غذایی و مواد مقرون صرفه بودن بعلت قیمت بالای این ترکیبات (اسانس ها) می باشد (Solomakos, Govaris et al. 2008).

نتایج آنالیز ترکیبات اسانس خارمشک با نام علمی اکینوفورا اورینتالیس (*Echinophora orientalis*) که در مرداد ماه از دامنه های کوه بینالود نیشابور جمع آوری شده بود، توسط GC-MS در مجموع ۴۳ ترکیب شناسایی شد که بیشترین ترکیبات اسانس گاما- دکالاکتون (۲۱/۱۵٪)، بتا- سیس اوسیمن (۱۵/۲۷٪)، لینالول (۸/۸۲٪)، اسپاتولنول (۷/۷۴٪)، اوژنول متیل اتر (۶/۶۱٪)، آلفا- ترپینئول (۳/۶۸٪) و آلفا- پینن (۳/۱۹٪) تشکیل دادند. این در حالی است که در سایر مطالعات صورت گرفته بر روی آنالیز اسانس مورد مطالعه درصد ترکیبات اسانس و نوع ترکیبات عمده موثره اسانس از هم متفاوت می باشد (Rahimi, Gholivand et al. 2010). در مطالعات گذشته ترکیبات اصلی اسانس حاصل از

GC-MS، شامل متیل اوژنول، دلتا کارن، پارا- سیمین بودند (Ozcan and Akgul 2003) (Chalchat,) (Ozcan et al. 2007) (Georgiou, Koutsaviti et al. 2010) (Gokbulut, Bilenler et al.) (2013) (Cetin, Kaya et al. 2016).

در مطالعه انتظاری و همکاران (۲۰۰۹) ترکیبات شیمیایی عمده شامل ترانس- بتا- اوسیمین، ۲- فورانون، لینالول بودند (Entezari, Hashemi et al. 2009). این در حالست که در مطالعه حاضر عمده ترین ترکیبات را گاما- دکالاکتون، بتا- سیس اوسیمین، لینالول، اسپاتونول، اوژنول متیل اتر تشکیل می دادند.

در مطالعه مظلومی فر و همکاران (۲۰۰۴) در بررسی تعیین ترکیبات شیمیایی اکیونفورا پلاتی لوبا (Echiophora platyloba) در ایران نشان داد ۲۹ ترکیب شیمیایی که در مجموع ۹۵/۳٪ از کل ترکیبات موجود در اسانس استخراج شده از گیاه شامل می شدند که توسط گاز GC-MS شناسایی شدند. ترکیبات عمده اسانس بتا-اوسیمین (۴۹/۹٪)، و به دنبال آن دکالاکتون (۸/۴٪)، آلفا- پینین (۶/۰٪)، لینالول (۵/۶٪) بودند (Mazloomifar,) (Saber-Tehrani et al. 2004).

در بررسی ترکیبات شیمیایی اسانس اکیونفورا اورینتاریس (Echinophora orientalis) که توسط انتظاری و همکاران (۲۰۰۹) انجام شد، گیاه مذکور از تپه های لشکرک شمال شرق تهران در تابستان جمع آوری شد. نتایج آنالیز GC-MS نشان داد ترانس- بتا- اوسیمین (۶۷/۹٪)، ۲- فورانون (۶٪)، لینالول (۳/۱٪) بیشترین درصد ترکیبات را تشکیل می دهد (Entezari, Hashemi et al. 2009).

در تحقیق دیگری توسط بنی ابراهیم و همکاران (۲۰۱۳) با هدف شناسایی ترکیبات شیمیایی اسانس گیاه اکیونفورا اورینتاریس (Echinophora orientalis) که از اذربایجان شرقی جمع آوری شده بود، بتا- میرسین (۳۲/۱٪)، آلفا-پینین (۱۶/۷٪)، پارا سیمین عمده ترکیبات مؤثره حاصل از آنالیز GC-MS اسانس شناخته شدند (Baniebrahim and Razavi 2013).

در مطالعه مقدم و همکاران (۲۰۱۵) که با هدف بررسی ترکیبات شیمیایی اسانس آبی اکینوفورا پلاتی لوبا (*Echiophora platyloba*) در ایران انجام شد در مجموع ۲۹ ترکیب موثره با ۸۸٪ از کل ترکیبات موجود در اسانس آنالیز شده توسط دستگاه GC-MS شناسایی شد. پارا سیمین (۲۲/۱۵٪)، آلفا-پینین (۱۸/۵۲٪)، بتا-فلاندرین (۱۴/۴۰٪)، آلفا-فلاندرین (۹/۶۹٪) ترکیبات اصلی اسانس را تشکیل می داد (Moghaddam, Taheri et al. 2015).

در مطالعه Ozcan و همکاران (۲۰۰۳) در ترکیه که با هدف مقایسه بازده اسانس و درصد ترکیبات شیمیایی در ماه های متفاوت انجام شد آنالیز گیاه اکینوفورا جمع آوری شده در ماه های April، May و June توسط دستگاه GC-MS انجام شد. بازده اسانس بر اساس وزن خشک به ترتیب ۰/۹٪، ۱/۳٪، ۱/۱٪ گزارش شد. درصد کل ترکیبات حاصل از آنالیز اسانس به ترتیب ۸۷/۲۵٪، ۹۶/۹۱٪، ۹۷/۳۸٪ که عمده ترین ترکیبات موثره آن شامل دلتا-کارن (۳۶/۹۸٪، ۳۸/۸٪ و ۳۰/۰۱٪)، متیل اوژنول (۲۱/۱۰٪، ۲۵/۴٪ و ۲۵/۹۶٪)، آلفا-فلاندرین (۱۴/۵٪، ۲۱/۷۱٪ و ۲۹/۲۶٪)، پارا-سیمین (۵/۰۸٪، ۲/۰۱٪، ۱/۹٪)، بتا-فلاندرین (۳/۱۱٪، ۳/۴۷٪ و ۴/۷٪) گزارش شد (Ozcan and Akgul 2003).

در مطالعه دیگر توسط Cetin و همکاران (۲۰۱۶) جهت آنالیز ترکیبات شیمیایی اکینوفورا تینیوفولیا (*Echinophora tenuifolia*) توسط گاز کروماتو گرافی متصل به طیف نگار جرمی انجام گرفت نشان داد متیل اوژنول (۵۳/۰٪)، پارا-سیمین (۱۷/۰٪)، آلفا فلاندرین (۱۳/۲٪) ترکیبات اصلی اسانس را تشکیل می دادند (Cetin, Kaya et al. 2016).

نتایج بدست آمده از تجزیه GC-MS اسانس در مطالعه حاضر تا حدودی با سایر بررسی ها همخوانی دارد. اختلاف در ترکیب شیمیایی و فعالیت ضد میکروبی اسانس ها در بین نتایج و گزارشات منتشر شده می تواند ناشی از تفاوت در فصل برداشت گیاه، شرایط آب و هوایی، منطقه جغرافیایی رویش، قسمت های مختلف گیاه، روش و مدت زمان استخراج اسانس مورد آزمایش باشد (Burt 2004).

از آنجا که اثر ممانعت کنندگی اسانس های گیاهی همراه در جلوگیری از رشد میکروارگانیسم های مختلف در مطالعات زیادی به اثبات رسیده است اما بررسی کمتری روی مدل های غذایی مختلف صورت گرفته است. در این جا اثر غلظت های مختلف گیاه بومی ایران، خارشک (در غلظت های ۰، ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵ $\mu\text{g ml}^{-1}$) بر باکتری بیماریزا استافیلوکوکوس اورئوس در محیط کشت آزمایشگاهی و مدل غذایی مورد مطالعه قرار گرفته است، زیرا بر اساس مطالعات گزارش شده مسمومیت غذایی استافیلوکوکی از مهمترین مسمومیت غذایی به شمار می آید به گونه ای که از مجموع حدود ۲۴ میلیون مورد مسمومیت گزارش شده در کشور ایالات متحده امریکا ۸/۹ میلیون مورد آن مربوط به استافیلوکوکوس اورئوس بوده که بیش از یک سوم موارد کل مسمومیت های غذایی در این کشور است (2008Misaghi, Moosavy et al).

بر اساس نتایج حاصل از این بررسی، اسانس خارشک علیه باکتری مورد مطالعه در محیط کشت موثر می باشد. نتایج ارزیابی میکروبی این مطالعه نشان داد که حداقل غلظت ممانعت کنندگی و حداقل غلظت کشندگی بر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در محیط آزمایشگاهی به روش میکرو دایلوویشن به ترتیب ۷۵ و ۱۲۵ $\mu\text{g ml}^{-1}$ می باشد.

فعالیت ضد میکروبی اسانس جدا شده از اکینوفورا در حال رشد در مناطق مختلف جهان قبلا گزارش شد و این گزارش ها نشان داد که اسانس گونه های مختلف اکینوفورا، فعالیت های ضد میکروبی در برابر میکروارگانیسم های مختلف از جمله باکتری های پاتوژن غذازاد و فعالیت ضد قارچی دارند (Zarali, Hojjati et al. 2016) (Moghaddam, Taheri et al. 2015) (Gokbulut (Avijgan, Hafizi et al. 2010) (Entezari, Hashemi et al. 2009) (Mileski, Dzamic et al. 2014)2013) (Andogan, Baydar et al. 2002).

در ارتباط با اثر اسانسهای مختلف بر باکتری مذکور در این مطالعه در محیط کشت آزمایشگاهی، بررسی های مختلفی صورت گرفته است. از جمله در مطالعه Cetin و همکاران (۲۰۰۵) نشان داده شد که اسانس خارشک اثر مهاری بر روی باکتری ها بیشتر از قارچ ها می باشد. اسانس رشد باکتری های پاتوژن از جمله سالمونلا، اشریشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس مهار کرد (Cetin, Kaya et al. 2016).

در مطالعه هاشمی و همکاران (۲۰۱۳) با هدف ارزیابی فعالیت ضد میکروبی اسانس اکینوفورا علیه باکتری های پاتوژن غذازاد در محیط کشت آزمایشگاهی درایران انجام شد. نتایج ارزیابی میکروبی نشان داد که حداقل غلظت ممانعت کنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) علیه لیستریا مونوسیتوزنتر و استافیلوکوکوس اورئوس به ترتیب $MIC = 1250 \mu g ml^{-1}$ و $MBC = 2500 \mu g ml^{-1}$ می باشد (Hashemi, Ehsani et al. 2013).

در تعدادی مطالعه دیگر نیز اثر ضد باکتریایی اسانس اکینوفورا بر روی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در محیط کشت آزمایشگاهی انجام شد (Glamoclija, 2011) (Saei-Dehkordi, Fallah et al. 2012) (Sharafati-) (Chaleshtori, Rafieian-kopaei et al. 2012) (Cetin, Kaya et al. 2016).

در مطالعه حاضر و دیگر مطالعات انجام شده در مبحث اثر ضدباکتریایی اسانس اکینوفورا نتایج متفاوتی گزارش شده که ممکن است اختلاف نتایج به دلیل تفاوت در ترکیبات مؤثره اسانس، نوع میکروب مورد مطالعه و تفاوت در روش آزمون میکروبی باشد.

تأثیر بکارگیری غلظت های مختلف اسانس خارمشک در سوپ جو تجارتی بر روی میانگین تعداد باکتری های استافیلوکوکوس اورئوس در دمای ۳ درجه سانتیگراد نشان داد در غلظت های $6/25 \mu g ml^{-1}$ و $0 \mu g ml^{-1}$ بین روزها اختلاف معنی دار است و همچنین بین تیمار 0 و سایر غلظت ها در یک گروه. تفاوت معنی دار مشاهده شد ($P < 0.05$).

مطالعات کمی در رابطه با اثر ضد میکروبی اسانس در مدل غذایی انجام شده و بیشتر مطالعات در حیطه تعیین ترکیبات شیمیایی و اثر ضد میکروبی در محیط آزمایشگاهی بوده است.

در مطالعه ای که توسط Deghirmencioghlu و همکاران (۲۰۰۵) در ترکیه انجام شد، اثر در تخمیر ترخینه که یکی از غذاهای سنتی ترکیه می باشد. نتایج مطالعه نشان داد اکینوفورا مانع از کاهش اسید لاکتیک باکتریها و

همچنین مخمر ها می شود. این نتایج نشان دهنده تأثیر مثبت در افزایش تخمیر در غذای ترخینه می باشد (Deghirmencioglu, Gocmen et al. 2005).

در مطالعه احسانی و همکاران (۲۰۱۶) با هدف تأثیر روغن اسانسی اکینوفورا پلاتی لوبا و لیکوپن در پایداری خامه پاستوریزه تهیه شده از شیر گاو. انجام شد. نتایج آزمون های میکروبی و شیمیایی خامه های پاستوریزه مورد آزمایش نشان داد که خامه های تیمار شده با ترکیب روغن اسانسی و لیکوپن در غلظت های بالاتر نشان دارای بهترین خواص میکروبی و شیمیایی و بیشترین پایداری در طول دوره نگهداری نسبت به کنترل بودند (Ehsani, Hashemi et al. 2016).

کیکاووسی و همکاران (۲۰۱۶) اثر ضد باکتریایی اسانس کلپوره علیه باسیلوس سرئوس در سوپ تجاری مورد بررسی قرار دادند (Keykavousi, Tarzi et al. 2016).

بر اساس نتایج آنالیز حسی، غلظت های مورد استفاده از اسانس خارشک در سوپ جو در مطالعه حاضر دارای پذیرش حسی مطلوبی بودند. اسانس های مورد مطالعه در غلظت $6/25 \mu\text{g ml}^{-1}$ بیشترین پذیرش حسی را داشتند، در حالیکه غلظت های بالاتر ($12/50$ و $25 \mu\text{g ml}^{-1}$) تأثیر نامطلوبی در خصوصیات حسی سوپ جو داشتند.

۵-۲- نتیجه گیری کلی:

۱. نتایج این مطالعه مبین اثر ضد باکتریایی اسانس خار مشک علیه استافیلوکوکوس اورئوس می باشد.
۲. مطالعه حاضر نشان داد اسانس مذکور در مدل غذایی مؤثر بر خواص ارگانولپتیک است.

۵-۳- قسمت ارائه پیشنهادات

۱. پیشنهاد می شود اجزاء موثره اسانس خارمشک تفکیک شده و هر کدام از اجزاء بطور مستقل مورد مطالعه قرار گیرد و با آنتی بیوتیک های استاندارد مقایسه شود.
۲. با توجه به اینکه مطالعه دیگری اثر ضد باکتریایی اسانس در مدل غذایی انجام نگرفته، پیشنهاد می شود اسانس مذکور در مدل های غذایی دیگر مورد مطالعه قرارگیرد.
۳. بدلیل تفاوت در حساسیت باکتری های مختلف نسبت به اسانس ها و اثر ترکیبات مواد غذایی بر روی کارایی اسانس ها، مطالعات بیشتری جهت کاربردی نمودن استفاده از اسانس ها در مواد غذایی ضروری بنظر می رسد.
۴. پیشنهاد می شود اثر اسانس مذکور بر روی دیگر پاتوژن ها و عوامل فساد، در مدل های غذایی مختلف مورد مطالعه قرار گیرد.
۵. اسانس مذکور می تواند در صنایع غذایی در غلظتهایی مختلف به عنوان یک افزودنی طبیعی مورد استفاده قرار گیرد.

- Adams, M. R. and L. Nicolaides (1997). "Review of the sensitivity of different foodborne pathogens to fermentation." *Food control* 8(5): 227-239.
- Ali, A., N. Tabanca, G. Ozek, T. Ozek, Z. Aytac, U. R. Bernier, N. M. Agramonte, K. H. C. Baser and I. A. Khan (2015). "Essential Oils of *Echinophora lamondiana* (Apiales: Umbelliferae): A Relationship Between Chemical Profile and Biting Deterrence and Larvicidal Activity Against Mosquitoes (Diptera: Culicidae)." *Journal of Medical Entomology* 52(1): 93-100.
- Amirghofran, Z., M. Bahmani, A. Azadmehr and K. Javidnia (2005). "Anticancer effects of various Iranian native medicinal plants on human tumor cell lines." *Neoplasma* 53(5): 428-433.
- Andogan, B. C., H. Baydar, S. Kaya, M. Demirci, D. Ozbaşar and E. Mumcu (2002). "Antimicrobial activity and chemical composition of some essential oils." *Archives of pharmacal research* 25(6): 860-864.
- Asghari, G. R., S. E. Sajjadi, H. Sadraei and K. Yaghobi (2010). "Essential oil constituents of *Echinophora platyloba* DC." *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* 2(3): 185-186.
- Avijgan, M., M. Hafizi, M. Saadat and M. A. Nilforoushzadeh (2010). "Antifungal effect of *Echinophora Platyloba*'s extract against *Candida albicans*." *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* 5(4): 285-289.
- Bagamboula, C., M. Uyttendaele and J. Debevere (2004). "Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and p-cymene towards *Shigella sonnei* and *S. flexneri*." *Food microbiology* 21(1): 33-42.
- Bahraminejad, S., S. Abbasi and M. Fazlali (2011). "In vitro antifungal activity of 63 Iranian plant species against three different plant pathogenic fungi." *African Journal of Biotechnology* 10(72): 16193-16201.
- Baniebrahim, S. and S. M. Razavi (2013). "Essential Oil Composition of *Echinophora oriemfalis* Hedge and Lamond Leaves from Iran." *pharmacologia* 4(8): 507-510.

Basti, A., A. Misaghi, M. Moosavy, T. Zahraei Salehi and G. Karim (2007). "Effect of *Zataria multiflora* Boiss. essential oil on the growth of *Staphylococcus aureus* in a commercial barley soup." *Journal of Medicinal Plants* 2(22): 91-98.

Bergdoll, M. (1990). "Symposium on microbiology update: old friends and new enemies. *Staphylococcus aureus*." *Journal-Association of Official Analytical Chemists* 74(4): 706-710.

Botsoglou, N., E. Christaki, D. Fletouris, P. Florou-Paneri and A. Spais (2002). "The effect of dietary oregano essential oil on lipid oxidation in raw and cooked chicken during refrigerated storage." *Meat Science* 62(2): 259-265.

Bozin, B., N. Mimica-Dukic, N. Simin and G. Anackov (2006). "Characterization of the volatile composition of essential oils of some Lamiaceae spices and the antimicrobial and antioxidant activities of the entire oils." *Journal of agricultural and food chemistry* 54(5): 1822-1828.

Bressolle, F., M. Bromet-Petit and M. Audran (1996). "Validation of liquid chromatographic and gas chromatographic methods Applications to pharmacokinetics." *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 686(1): 3-10.

Bullerman, L., F. Lieu and S. A. Seier (1977). "Inhibition of growth and aflatoxin production by cinnamon and clove oils. Cinnamic aldehyde and eugenol." *Journal of Food Science* 42(4): 1107-1109.

Burits, M. and F. Bucar (2000). "Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil." *Phytotherapy Research* 14(5): 323-328.

Burt, S. (2004). "Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review." *International journal of food microbiology* 94(3): 223-253.

Cavalli, J. F., F. Tomi, A. F. Bernardini and J. Casanova (2004). "Combined analysis of the essential oil of *Chenopodium ambrosioides* by GC, GC-MS and ¹³C-NMR spectroscopy: quantitative determination of ascaridole, a heat-sensitive compound." *Phytochemical Analysis* 15(5): 275-279.

Celiktas, O. Y., E. H. Kocabas, E. Bedir, F. V. Sukan, T. Ozek and K. Baser (2007). "Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of

Rosmarinus officinalis, depending on location and seasonal variations." *Food Chemistry* 100(2): 553-559.

Cetin, B., Y. Kaya, A. Cakır, H. Ozer, O. Aksakal and E. Mete (2016). "Antimicrobial Activities of Essential Oils and Hexane Extracts of Two Turkish Spice Plants, *Cymbocarpum erythraeum* (DC.) Boiss. and *Echinophora tenuifolia* L. Against Foodborne Microorganisms." *Records of Natural Products* 10(4): 426-436.

Chalchat, J., M. Ozcan, A. Dagdelen and A .Akgul (2007). "Variability of essential oil composition of *Echinophora tenuifolia* subsp. *sibthorpiana* Tutin by harvest location and year and oil storage." *Chemistry of Natural Compounds* 43(2): 225-227.

Choobkar, N., M. Soltani, H. Ebrahimzadeh Mousavi, A .Akhonzadeh Basti and A. Matinfar (2010). "Effect of *Zataria multiflora* Boiss essential oil on the growth of *Staphylococcus aureus* in the light salted fillets of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*)." *Iranian Journal of Fisheries Sciences* 9(3): 352-359.

Cleveland, J., T. J. Montville, I. F. Nes and M. L. Chikindas (2001). "Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation." *International journal of food microbiology* 71(1): 1-20.

Cowan, M. M. (1999). "Plant products as antimicrobial agents." *Clinical microbiology reviews* 12(4): 564-582.

Daferera, D. J., B. N. Ziogas and M. G. Polissiou (2000). "GC-MS analysis of essential oils from some Greek aromatic plants and their fungitoxicity on *Penicillium digitatum*." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48(6): 2576-2581.

Deghirmencioghlu, N., D. Gocmen, A. Daghdelen and F. Daghdelen (2005). "Influence of Tarhana Herb(*Echinophora sibthorpiana*) on Fermentation of Tarhana, Turkish Traditional Fermented Food." *Food Technology and Biotechnology* 43(2) :175-179.

Delaram, M. and Z. Sadeghiyan (2010). "The effect of *echinophora-platyloba* extract on primary of dysmenorrhea." *Arak Medical University Journal* 13(3): 61-67.

Ehsani, A., M. Hashemi, N. H. Jazani, J. Aliakbarlu, S. Shokri and S. S. Naghibi (2016). "Effect of *Echinophora platyloba* DC. essential oil and lycopene on the stability of pasteurized cream obtained from cow milk." Veterinary Research Forum 7(2):139-148

Entezari, M., M. Hashemi, M. Ashki, S. Ebrahimian, M. Bayat, A. Azizi Saraji and S. Rohani (2009). "Studying the effect *Echinophora platyloba* extract on bacteria (*Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*) and fungi (*Candida albicans*, *Aspergillus flavus* and *Aspergillus niger*) in vitro." World J Med Sci 4(2): 89-92.

Fahimeh, P. c., M. Ali, S. e. Flora and B. Giti (2013). "Comparison of the antibacterial properties of essential oils of four species of medicinal plants sage. *Salvia L.*" Research in Medicine 37(4): 205-210.

Farag, R., M. Ali and S. Taha (1990). "Use of some essential oils as natural preservatives for butter." Journal of the American Oil Chemists' Society 67(3): 188-191.

Fayyaz, N., A. MohamadiSani and M. N. Najafi (2015). "The study prickly parsnip extract effects on durability of heat treated Doogh." DAMA International 4(3): 2319–5037.

Feyzi, P. and H. H. maghadam (2013). "Comparison of essential oil extracted by steam distillation (HD) and extraction with microwave (MD) and the effect on the percentage of extraction and chemical composition, and biological activity of essential oil extraction efficiency." National Conference on natural products and medicinal plants. 4: 35-41. (In persian)

Frazier, W. and D. Westhoff (1958). Food microbiology, Toronto: Mc. Gasman, E. (1967). "Staphylococcal food poisoning." Health laboratory science 4(4): 199-206.

Georgiou, C., A. Koutsaviti, I. Bazos and O. Tzakou (2010). "Chemical composition of *Echinophora tenuifolia* subsp. *sibthorpiana* essential oil from Greece." Rec. Nat. Prod 4(3): 167-170.

Glamoclija, J. M., M. D. Sokovic, J. D. Siljegovic, M. S. Ristic, A. D. Ciric and D. V. Grubisic (2011). "Chemical composition and antimicrobial activity of *Echinophora spinosa* L. (Apiaceae) essential oil." Rec. Nat. Prod 5(4): 319-323.

Gokbulut, I., T. Bilenler and I. Karabulut (2013). "Determination of chemical composition, total phenolic, antimicrobial, and antioxidant activities of *Echinophora tenuifolia* essential oil." *International Journal of Food Properties* 16(7): 1442-1451.

Gulluce, M., F. Sahin, M. Sokmen, H. Ozer, D. Daferera, A. Sokmen, M. Polissiou, A. Adiguzel and H. Ozkan (2007). "Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oils and methanol extract from *Mentha longifolia* L. ssp. *longifolia*." *Food chemistry* 103(4): 1449-1456.

Hashemi, M., A. Ehsani, N. H. Jazani, J. Aliakbarlu and R. Mahmoudi (2013). "Chemical composition and in vitro antibacterial activity of essential oil and methanol extract of *Echinophora platyloba* DC against some of food-borne pathogenic bacteria." In *Veterinary Research Forum*, 4(2): 123.

Hassanpouraghdam, M. B., M. S. Shalamzari and N. Sepehri (2009). "GC/MS analysis of *Echinophora platyloba* DC. essential oil from Northwest Iran: a potential source of (Z)- β -ocimene and α -phellandrene." *chemija* 20(2): 120-123.

Holley, R. A. and D. Patel (2005). "Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials." *Food Microbiology* 22(4): 273-292.

Hussain, A. I., F. Anwar, S. T. H. Sherazi and R. Przybylski (2008). "Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations." *Food Chemistry* 108(3): 986-995.

Iravani, M. and Z. Jaberlansar (2003). celery mountain P. Jafarzadeh, K. K., M. M. Aghazadeh, A. Sharifan and K. Larijani (2010). "Rosemary oil effects on the growth of *Staphylococcus aureus* in bouillons business." *Comparative Pathobiology* 7(2): 255-264.

Jaimand, K. and M. Rezaee (2003). "Investigation extraction by two different apparatus and effects of essential oils on content and constituents of *Tripleurospermum disciforme* (CA Mey) Schultz-Bip." *Pajouhesh And Sazandegi* 16(3): 2-7.

Jalilvand, M., A. Vakili, N. Amini Moghaddam Faroj, A. Nematollahi, H. Kamali and M. Sodmand (2011). "Attitude of applied research in natural products and of medicinal plants." *North Khorasan*.

Jay, J.M., Loessner, M.J., Golden, D.A., (2005). Modern food microbiology, 7th edition, New York: Springer Science, Inc; p: 583-590

Keykavousi M, Tarzi B.,G., Mahmoudi R., Babakhoda H., Kabudari A., and S. F. R. P. Mahalleh (2016). "Study of antibacterial effect of Teucrium polium essential oil on bacillus cereus in cultural laboratory and commercial soup." Carpathian Journal of food science and technology 8(2): 176-183.

Khajenoori, M., A. H. Asl and H. N. Bidgoli (2013). "Subcritical water extration of essential oils from matricaria Chamomilla L." International Journal of Engineering-Transactions B: Applications 26(5): 489.

Krishnamurthy, K., A. Demirci and J. Irudayaraj (2008). "Inactivation of Staphylococcus aureus in milk and milk foam by pulsed UV-light treatment and surface response modeling." Transactions of the ASABE 51(6): 2083-2090.

Lambert, R., P. N. Skandamis, P. J. Coote and G. J. Nychas (2001). "A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol." Journal of applied microbiology 91(3): 453-462.

Le Loir, Y., F. Baron and M. Gautier (2003). "Staphylococcus aureus and food poisoning." Genet Mol Res 2(1): 63-76.

Liggins, R. T. and H. M. Burt (2004). "Paclitaxel-loaded poly (L-lactic acid) microspheres 3: blending low and high molecular weight polymers to control morphology and drug release." International journal of pharmaceutics 282(1): 61-71.

Lowy, F. D. (1998). "Staphylococcus aureus infections." New England journal of medicine 339(8): 520-532.

HatamiVarzaneh, M. (2002). Secret health with herbs, Esfahan: Fahmideh Shahid Publishing; p.254.

Mann, C. and J. Markham (1998). "A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils." Journal of Applied Microbiology 84(4): 538-544.

Marston, A. (2007). "Role of advances in chromatographic techniques in phytochemistry." *Phytochemistry* 68(22): 2786-2798.

Matejic, J. S., A. M. Dzamic, T. Mihajilov-Krstev, M. S. Ristic, V. N. Randelovic, Z. D. Krivošej and P. D. Marin (2016). "Chemical Composition, Antioxidant and Antimicrobial Properties of Essential Oil and Extracts from *Heracleum sphondylium* L." *Journal of Essential Oil Bearing Plants* 19(4): 944-953.

Mazloomifar, H., M. Saber-Tehrani, A. Rustaiyan and S. Masoudi (2004). "Constituents of the essential oil of *Echinophora platyloba* DC. growing wild in Iran." *Journal of Essential Oil Research* 16(4): 284-285.

Mendoza, C., F. E. Viteri, B. Lönnerdal, K. A. Young, V. Raboy and K. H. Brown (1998). "Effect of genetically modified, low-phytic acid maize on absorption of iron from tortillas." *The American journal of clinical nutrition* 68(5): 1123-1127.

Michielin, E. M., A. A. Salvador, C. A. Riehl, A. Smânia, E. F. Smânia and S. R. Ferreira (2009). "Chemical composition and antibacterial activity of *Cordia verbenacea* extracts obtained by different methods." *Bioresource technology* 100(24): 6615-6623.

Mileski, K., A. Dzamic, A. Ciric, S. Grujic, M. Ristic, V. Matevski and P. Marin (2014). "Radical scavenging and antimicrobial activity of essential oil and extracts of *Echinophora sibthorpiana* Guss. from Macedonia." *Archives of Biological Sciences* 66(1): 401-413.

Misaghi, A., M. Moosavy, T. Salehi and G. karim (2008). "Thyme essential effect on the growth of *Staphylococcus aureus* in the soup business." *Food Research International* 41(10): 1050-1057.

Moghaddam, M., P. Taheri, A. G. Pirbalouti and L. Mehdizadeh (2015). "Chemical composition and antifungal activity of essential oil from the seed of *Echinophora platyloba* DC. against phytopathogens fungi by two different screening methods." *LWT-Food Science and Technology* 61(2): 536-542.

Naidu, S.A. (2000). *Natural food antimicrobial system*, 1 th ed, Washington: CRC press; p. 265-278,463-493.

Nychas, G., P. Skandamis, C. Tassou and S. Roller (2003). "Antimicrobials from herbs and spices." *Natural antimicrobials for the minimal processing of foods*: 176-200.

Omaye, S. T. (2004). *Food and nutritional toxicology*, CRC press. Ozcan, M. and A. Akgul (2003). "Essential oil composition of Turkish pickling herb (*Echinophora tenuifolia* L. subsp. *sibthorpiana* (Guss.) Tutin)." *Acta Botanica Hungarica* 45(1-2): 163-167.

Pajohi, M. R., H. Tajik, A. A. Farshid, A. A. Basti and M. Hadian (2011). "Effects of *Mentha longifolia* L. essential oil and nisin alone and in combination on *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis* in a food model and bacterial ultrastructural changes." *Foodborne pathogens and disease* 8(2): 283-290.

Pajuh Alamuti, m., T. Hosein, A. Akhondzadeh, H. Gandomi Nasrabadi and A. Ehsani (2012). "Study the chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from oregano (*Mentha longifolia* L.) and cumin (*Cuminum cyminum* L.) in the soup". 9(36): 33-45. (In persian)

Pass, M., M. Rashidipour, G. Talei and B. Doosty (2012). "Chemical compositions, antibacterial and antioxidant properties of *Echinophora cinerea* essential oil." *Journal of Herbal Drugs (An International Journal on Medicinal Herbs)* 3(2): 67-74.

Peterson, B. L. and B. S. Cummings (2006). "A review of chromatographic methods for the assessment of phospholipids in biological samples." *Biomedical Chromatography* 20(3): 227-243.

Pirbalouti, A. G., P. Jahanbazi, S. Enteshari, F. Malekpoor and B. Hamed (2010). "Antimicrobial activity of some Iranian medicinal plants." *Arch Biol Sci* 62(3): 633-642.

Pirbalouti, A. G., F. Malekpoor and B. Hamed (2012). "Ethnobotany and antimicrobial activity of medicinal plants of Bakhtiari Zagross mountains, Iran " *Journal of Medicinal Plants Research* 6(5): 675-679.

Prakash, B., A. Kedia, P. K. Mishra and N. Dubey (2015). "Plant essential oils as food preservatives to control moulds, mycotoxin contamination and oxidative deterioration of agri-food commodities–Potentials and challenges." *Food Control* 47: 381-391.

Ranjbar, S., M. Noori and R. Nazari (2010). "Study of milk aflatoxin M1 and its relationship with feed fungi flora in Markazi Province." *Journal of Cell & Tissue* 1(1): 9-18

Rahimi, N. M., M. Gholivand, M. Niasari and A. Vatanara (2010). "Chemical composition of the essential oil from aerial parts of *Echinophora platyloba* DC. from Iran." *Journal of Medicinal Plants* 1(33): 53-56.

Rezoiler, V. (2002). *Epidemiology of pathogenic bacteria in food and food poisoning*. 2th ed Iran: printed publications Institute of Tehran University; p. 153-157.

Russell, N. J. and G. W. Gould (2003). *Food preservatives*. 2th ed New York: Springer Science & Business Media; p.150-161

Russo, M., G. C. Galletti, P. Bocchini and A. Carnacini (1998). "Essential Oil Chemical Composition of Wild Populations of Italian Oregano Spice (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum* (Link (Ietswaart): A Preliminary Evaluation of Their Use in Chemotaxonomy by Cluster Analysis. 1. Inflorescences." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46(9): 3741-3746.

Saei-Dehkordi, S. S., A. A. Fallah, S. S. Saei-Dehkordi and S. Kousha (2012). "Chemical Composition and Antioxidative Activity of *Echinophora platyloba* DC. Essential Oil, and Its Interaction with Natural Antimicrobials against Food-Borne Pathogens and Spoilage Organisms." *Journal of food science* 77(11): 631-637.

Sharafati-chalesshtori, R., M. Rafieian-kopaei, S. Mortezaei, A. Sharafati-chalesshtori and E. Amini (2012). "Antioxidant and antibacterial activity of the extracts of *Echinophora platyloba* DC." *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* 6(37): 2692-2695.

Silva, N. and A. Fernandes Júnior (2010). "Biological properties of medicinal plants: a review of their antimicrobial activity." *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases* 16(3): 402-413.

Sirajuddin, M. F. "Medical treatment plants in ancient Iran." *Medical History* 2(2): 11-33.

Solomakos, N., A. Govaris, P. Koidis and N. Botsoglou (2008). "The antimicrobial effect of thyme essential oil, nisin, and their combination

against *Listeria monocytogenes* in minced beef during refrigerated storage." *Food microbiology* 25(1): 120-127.

Sparkman, O. D. (2005). "Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy Robert P. Adams." *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 16(11): 1902-1903.

Speck, M. L. (1992). *Compendium of methods for the microbiological examination*[dissertation]. Washington, DC: American Public Health Association; p. 105-119, 325-367, 371-415, 451-469 & 637-658.

Sutherland, J. and A. Varnam (2002). "Enterotoxin-producing *Staphylococcus*, *Shigella*, *Yersinia*, *Vibrio*, *Aeromonas* and *Plesiomonas*." *Foodborne pathogens*: 384-415.

Winn, W.C., Koneman, E.W., Allen, S.D., Janda, W.M., Schreckenberger, P.C., Procop, G.W., Woods, G.L., 2006. *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. 6th Ed. Lippincott Williams and Wilkins: P. 75-782.

Zarali, M., M. Hojjati, S. T. Didehban and H. Jooineh (2016). "Evaluation of chemical composition and antibacterial activities of *Echinophora cinerea* Boiss and *Stachys lavandulifolia* Vahl essential oils in vitro." *Journal of Food Science & Technology* 13(52): 149-160.

Zare, P., R. Mahmoudi and A. Ehsani (2011). "Biochemical and antibacterial properties of essential oil from *Teucrium polium* using resazurin as the indicator of bacterial cell growth." *Pharm Sci* 17(3): 183-188.

Zargari (1994). *Medicinal Plants*, 6 th ed. Tehran: Printing & Publishing Institute of Tehran University; p.1-154. (inpersian)

Zarshenas, Z. (2016). "Medicine in Ancient Iran." *History of Medicine Journal* 1(1):11-35.(Inpersian)

Identification of antibacterial effect of *Echinophora Orientalis* essential oil on *Staphylococcus aureus* in vitro and Food model

Abstract

Background: Reduce food safety, increase the harmful effects of chemical preservatives, antibiotic resistance of pathogenic bacteria in food researchers to study in the field of alternative natural compounds, particularly the use of essential oils has attracted. In recent years, extensive studies have antimicrobial activity of essential oils is proved.

Objectives: The present study was conducted to investigate the effects of *Echinophora. Orientalis* essential oil on *Staphylococcus aureus* in vitro and food model.

Materials and Methods: The air-dried plants of *E. spinosa* were submitted for 3 h to water-distillation using Clevenger apparatus. The obtained essential oils were stored at +4 °C until tested and analyzed. Qualitative and quantitative analyses of the oils were performed using GC and Gas chromatography–mass; and evaluated for its antimicrobial activity.

Results: In total 43 components were identified by GC-MS analyses, comprising 99.05% of the volatile oil, of which γ -decalactone (21.15%), β -cis-Ocimene (15.27%), Linalool L (8.82%), Spathulenol (7.74%), Eugenol methyl ether (6.61%) were the major Components. Results of antimicrobial activity of essential oil showed that the minimal inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) against *Staphylococcus aureus* were 75 and 125 micrograms per milliliter, respectively. Essential oil showed strong antimicrobial activity against tested bacteria in food model in the temperature 3 °C.

Concloution: According to the results, it is suggested that *E.Orientalis* EO used as the strong preservative and a flavoring agent in foods.

Keywords: *Echinophora.Orientalis*, EO, Gas chromatography–mass, *Staphylococcus aureus*, antimicrobial activity



**Qazvin university of Medical Sciences
Faculty of Health**

Thesis Submitted for the degree of M.Sc. in Health and Food Safety

Title:

**Identification of antibacterial effect of Echinophora Orientalis essential oil
on Staphylococcus aureus in vitro and Food model**

Supervisor:

Dr. Peyman Ghajarbeygi

Adviser:

Dr. Razzagh Mahmoudi

By:

Effat Farzaneh nia

September-2016